

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/057464 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/82** (74) **Anwalt: GOLDSCHIED, Bettina**; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00461
- (22) Internationales Anmeldedatum:
18. Januar 2002 (18.01.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 02 338.3 19. Januar 2001 (19.01.2001) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).**
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens [DE/SE]; Onsjövägen 17, S-26831 Svalöv (SE). DUWENIG, Elke [DE/DE]; Schanzstraße 46, 67063 Ludwigshafen (DE). BISCHOFF, Friedrich [DE/DE]; Albinstrasse 11, 55116 Mainz (DE). HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). DREXLER, Hjärdis [DE/DE]; Mendelssohnstr. 33, 22761 Hambourg (DE). SCHEFFLER, Jodi [US/US]; 51 County Road 228, Oxford, MS 38655 (US).**
- (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** METHOD FOR THE EXPRESSION OF BIOSYNTHETIC GENES IN PLANT SEEDS USING NOVEL MULTIPLE EXPRESSION CONSTRUCTS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR EXPRESSION VON BIOSYNTHESEGENEN IN PFLANZLICHEN SAMEN UNTER VERWENDUNG VON NEUEN MULTIPLN EXPRESSIONSKONSTRUKTEN

(57) **Abstract:** The invention relates to expression cassettes, combinations thereof and vectors containing said expression cassettes, containing plant promoters with an expression specificity for plant seeds, in particular linseed and the use of said expression cassettes or vectors for the recombinant expression of heterologous genes in plants. The invention further relates to transgenic plants, transformed by means of said expression cassettes, or vectors, cultures, parts or transgenic propagations derived therefrom and the use of the above as foodstuff, animal feedstuff, seedstuff, pharmaceuticals, fine chemicals or industrial raw material.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, deren Kombination und Vektoren enthaltend die Expressionskassetten, die pflanzliche Promotoren mit einer Expressionsspezifität für pflanzliche Samen insbesondere Leinsamen enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur rekombinanten Expression heterologer Gene in Pflanzen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben als Nahrungs-, Futtermittel oder Saatgut, Pharmazeutika, Feinchemikalien oder als industrieller Grundstoff.

WO 02/057464 A2

Verfahren zur Expression von Biosynthesegenen in pflanzlichen Samen unter Verwendung von neuen multiplen Expressionskonstrukten

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, deren Kombination und Vektoren enthaltend die Expressionskassetten, die pflanzliche Promotoren mit einer Expressionsspezifität für pflanzliche Samen
10 insbesondere Leinsamen enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur rekombinanten Expression heterologer Gene in Pflanzen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder transgenes
15 Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben als Nahrungs-, Futtermittel oder Saatgut, Pharmazeutika, Feinchemikalien oder als industrieller Grundstoff.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten werden vorteilhaft in
20 einem Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen verwendet. Im Verfahren finden vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen
25 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder 11 Anwendung, die unter Verwendung der Expressionskassetten exprimiert werden. Diese vorgenannten Nukleinsäuren sind im Verfahren sowie zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt
30 an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit ungesättigten C₁₈-, C₂₀-, oder C₂₂-Fettsäuren geeignet. Außerdem können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassetten weitere Gene neben den Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 11 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga sowie
35 Genkonstrukte, die diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst, sowie Ihre Verwendung allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen bevorzugt Biosynthesegene für polyungesättigter Fettsäuren, wie vorteilhaft in SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 9 dargestellt, in Organismen bevorzugt Pflanzen exprimiert
40 werden.

Eine Reihe von Produkten und Nebenprodukten natürlich vorkommender Stoffwechselprozesse in Mikroorganismen, tierischen und pflanzlichen Zellen sind für viele Industriezweige, ein-
45 schließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören beispielsweise

2

Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. PUFAs haben weiterhin einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herzkrankheiten. So finden sie in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Thraustochytrien oder Schizochytrien-Stämme, Algen wie Phaeodactylum tricornutum oder Cryptocodinium-Arten, Ciliaten, wie Stylonychia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor. Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren.

Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneterweise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind, dass sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten, sind gut geeignet, wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung ist eine Reihe von Mutantpflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren. Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwändiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommt, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀-Fettsäuren und C₂₂-Fettsäuren und solchen mit längeren Kohlenstoffketten.

3

Aufgrund der positiven Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, dass die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Weder in Hefen noch in Pflanzen werden natürlicherweise mehrfach ungesättigte C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) hergestellt.

40

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Keines der bisher bekannten biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von mehrfach

ungesättigten Fettsäuren liefert die vorgenannten Fettsäuren in wirtschaftlich nutzbaren Mengen.

Bei der Expression von Genen in Pflanzen gibt es immer wieder
5 Probleme, dass heißt es kommt durch die Expression nicht zur erwarteten Steigerung bei der Herstellung des gewünschten Wertprodukts.

Verschiedene Methoden zum Einschleusen von Genen in das Genom von
10 Pflanzen sind bekannt (Halford NG, Shewry PR, Br. Med. Bull., 2000; 56: 62-73). Ziel ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften, zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder
15 Pharmazeutika (Dunwell JM, J. Exp. Bot., 2000: 51 Spec No: 487-96).

Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene ist die Bereitstellung pflanzenspezifischer Promotoren. Pro-
20 motoren sind wichtige Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie, um die Expression eines bestimmten Gens in einer transgenen Pflanze lokal und zeitlich zu steuern und so bestimmte Wesensmerkmale der Pflanze auszunutzen bzw. erst zu erzielen. Verschiedene Promotoren für diverse Pflanzenarten, bestimmte Pflanzengewebe und Ent-
25 wicklungsstadien sind bekannt.

Verwendet werden zum Beispiel konstitutive Promotoren wie der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor oder der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmo-
30 saikvirus (CaMV) (Odell et al., Nature 1985: 313,810-812), der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol. Biol. 1995, 29:637-646), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).
35 Nachteilig bei diesen Promotoren ist, dass sie in fast allen Geweben der Pflanze konstitutiv aktiv sind. Eine gezielte Expression von Genen in bestimmten Pflanzenteilen oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten ist mit diesen Promotoren nicht möglich.

40 Promotoren, deren Aktivität gewebsspezifisch oder entwicklungsabhängig reguliert ist, wurden isoliert. Spezifitäten sind für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen beschrieben. Die Stringenz der Spezifität, als auch die Expressionsaktivität dieser Promotoren ist sehr unterschiedlich. Zu
45 nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten, wie der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubi-

sco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

- 5 Weitere Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie
10 beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO
15 98/22593).

Eine Variation der Aktivität eines Promotoren anhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze wird unter anderem von Baerson et al. beschrieben (Baerson SR, Lamppa GK. Plant Mol Biol.

- 20 1993;22(2):255-67).

- Samenspezifische Promotoren sind aufgrund der Bedeutung des Samens als eine der Hauptnahrungs- bzw. Futterquellen von Mensch und Tier und als Produktionsort für Wertstoffe von besonderen Interesse. Bekannt sind Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. So wurden beispielsweise die Promotoren von Genen identifiziert, die für Speicherproteine verschiedener Dicotyledonen kodieren. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5504200, Bustos
25 MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et
30 al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen genet 1991, 225: 121-128). Diese steuern eine hohe samenspezifische Expression von Speicherproteinen.

- 40 Trotz der allgemeinen Annahme, daß pflanzliche Promotoren von einer Spezies auf die andere Übertragbar sind und auch in artfremden Pflanzenspezies ähnliche Aktivitäten und Spezifitäten aufweisen, mehren sich Hinweise auf Einschränkungen von dieser Annahme. So zeigte es sich, daß die Höhe der transgenen Expression von heterologen Genen unter Kontrolle dieser Promotoren, oft stark von
45 der Art der Wirtspflanze abhängig ist. Es wurde festgestellt, dass die Expression nicht immer absolut zelltypspezifisch ist.

Unterschiede im Expressionsmuster und der Expressionsstärke eines bestimmten Promotors können durch unterschiedliche Wirtspflanzen oder durch unterschiedliche Insertionsorte in das Genom der Wirtspflanze bedingt sein (Goossens A et al., Plant Phys 1999, 5 120:1095-1104).

Durch eine Genexpression in anderen Pflanzenteilen kann die Verwendung eines Promotors in einer anderen Pflanzenart sehr eingeschränkt sein. Etwa wenn die Expression des Genes in den Metabolismus der Zelle, die Zusammensetzung der Membranlipide oder die 10 Biosynthese eingreift.

Es bestand daher die Aufgabe weitere Expressionskassetten für die Expression in Pflanzen zur Verfügung zu stellen. Und diese für 15 die Expression von Genen vorteilhaft Biosynthesegenen allein oder gegebenenfalls in Kombination mit anderen Enzymen in einem Verfahren beispielsweise zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu verwenden. Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäßen Expressionskassette mit einer Struktur ausgewählt 20 aus der Gruppe gelöst:

- a) L1 - Promotor - Strukturgen - L2,
- b) L1 - Promotor - Strukturgen - L2 - L1 - Promotor - Struktur- 25 gen - L2,
- c) L1 - Promotor - Strukturgen - L2 - L1 - Promotor - Strukturgen - L2 - L1 - Promotor - Strukturgen - L2,

30 wobei L1, L2, Promotor und Strukturgen die folgende Bedeutung hat:

L1 = SEQ ID NO: 32 oder eine äquivalente Restriktionsschnittstellen enthaltende Sequenz,

35

L2 = unabhängig voneinander SEQ ID NO: 33, 34 oder 35 oder äquivalente Restriktionsschnittstellen enthaltende Sequenzen,

Promotor = pflanzlicher Promotor

40

Strukturgen = eine in Pflanzen exprimierbare Nukleinsäuresequenz.

Vorteilhaft ist das Strukturgen ein Biosynthesegen, bevorzugt 45 ist es ein Biosynthesegen des Lipid- oder Fettsäurestoffwechsels, vorteilhaft ein pflanzliches Gen. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist das Strukturgen eine Nukleinsäuresequenz,

die für Proteine ausgewählt aus der Gruppe :

Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n), kodiert.

10 Ganz besonders bevorzugt ist das Strukturgen eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,

15

b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,

20

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

25

Unter einer äquivalente Restriktionsschnittstellen enthaltende Sequenz im Sinne der Erfindung sind Sequenzen zu verstehen, die Restriktionsschnittstellen enthalten, die für den Aufbau multiplexer Expressionskassetten geeignet sind, das heißt geeigneter Weise nicht im Strukturgen vorhanden sind oder im binären Vektor. Solche Restriktionsschnittstellen wie beispielhaft EcoRI, BamHI, 35 SacI, PstI, NcoI, NdeI, BglI, BglII, XhoI, Xba und weitere sind dem Fachmann bekannt und können einschlägigen Fachbüchern entnommen werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können für die Expression von Genen in wirtschaftlich wichtigen Kulturpflanzen wie beispielsweise Lein, für die keine endogenen samenspezifischen Promotoren bekannt waren, verwendet werden. Lein ist, wie die vorliegenden Arbeiten zeigten, für eine samenspezifische Expression von Genen besonders problematisch, da offensichtlich mehrere 45 Promotoren, die vom Fachmann für samenspezifische Expression in anderen Pflanzen routinemäßig benutzt werden, in z.B. in anderen Pflanzen wie Lein nicht funktionieren, das heißt nicht zu einer

Transkription bzw. letztlich zu einer Expression der mRNA des Strukturgens führt.

Verwendung der oben genannten erfindungsgemäßen Expressionskas-

5 setzen in einem Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten
- 15 genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5
- 20 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung
- 25 der Polypeptide wesentlich reduziert ist,

in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt, anzieht und die dem Organismus enthaltenden Fettsäureester isoliert.

- 30 Bei den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Desaturaseaktivität codieren.

- 35 Im Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Bevorzugt enthalten diese Fettsäuremoleküle drei, vier oder fünf Doppelbindungen und führen vorteilhaft zur Synthese von Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

- Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Her-
- 45 stellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide,

Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, isoliert werden.

5

Als Organismus für die Herstellung im Verfahren kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen wie prokaryontische oder eukaryontische Mikroorganismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien, Pilze, Hefen, Algen, Ciliaten, tierische oder pflanzliche Zellen, Tiere oder Pflanzen wie Moose, 10 zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen in Frage. Vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Mikroorganismen wie *Crypthecodinium*, *Thraustochytrium*, *Phaeodactylum* und 15 *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Crypthecodinium* sowie andere Algen oder Pilze sowie Tiere oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, 20 Safflor, Nachtkerze, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, 25 Tee), *Salix*-Arten, Bäume (Ölplame, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor oder Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

30

Das Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten transgenen Organismus bzw. transgenen Mikroorganismus oder die Züchtung von transgenen Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gegebenenfalls in Verbindungen 35 mit den in SEQ ID NO: 7 und/oder SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenzen allein oder in Kombination mit Sequenzen von vorteilhaften erfindungsgemäßen Expressionskassetten in vorteilhaften Vektoren mit SEQ ID NO: 13-17 oder ihre Homologen, Derivate oder 40 Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 ggf. in Verbindung mit SEQ ID NO: 7 und/oder 9 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst, oder einen Vektor, der diese Sequenz oder das Genkonstrukt umfasst, welches die Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle herbeiführt, so dass eine 45 Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Nukleinsäuresequen-

10

zen enthält, wobei eine Zelle mit einer Desaturasenukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die Expression einer erfindungsgemäßen Desaturasenukleinsäure allein oder in Kombination herbeiführen, transformiert wird. Bei einer
5 weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform gehört die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfruchtpflanzen,
10 besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Soja, Safflower (Distel), Sonnenblumen oder Borretsch.

Unter transgen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, daß die
15 im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren oder die erfindungsgemäßen Expressionskassetten nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch, dass die Nukleinsäuren oder Expressionskassetten an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder
20 das die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom
25 zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind die oben genannten transgenen Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen.

30 Aus den im Verfahren hergestellten Fettsäureestern lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung wie wässrige KOH oder NaOH vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließen-
35 der Ansäuerung über z.B. H_2SO_4 .

Die im Verfahren hergestellten Fettsäureester fallen in Form von Ölen, Lipiden und/oder Fettsäuren an, die mindestens zwei Doppelbindungen in den Fettsäuremolekülen bevorzugt drei, vier, fünf
40 oder sechs Doppelbindungen enthalten. Auch sind Zusammensetzungen, die die genannten Öl-, Lipid- und/oder Fettsäuren enthalten, sowie die Verwendung der Öle, Lipide und/oder Fettsäuren oder der Zusammensetzungen in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika ein weiterer Anwendungsmöglichkeit der vorgenannten
45 Stoffe.

11

- Ein weiterer Aspekt betrifft ein Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die erfindungsgemäßen Desaturaseaktivität allein oder in
- 5 Kombination oder die Desaturasenukleinsäureexpression moduliert, so dass eine zellassozierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg(e) der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Cofaktoren und En-
- 10 zyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so dass die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die Desaturaseaktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die
- 15 Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression stimulieren, sind u.a. kleine Moleküle, aktive Desaturasen sowie
- 20 desaturasenkodierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder -Expression hemmen, sind u.a. kleine Moleküle und Antisense- Desaturasenukleinsäuremoleküle.
- 25 Ein weiterer Aspekt betrifft ein Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-Desaturasegens, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in
- 30 das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funk-
- 35 tionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.
- 40 Bei einer bevorzugten Form des Verfahrens sind die Ausbeuten modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die gewünschte Fein-
- 45 chemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein Enzym. Bei besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevor-

12

zugt ist sie ausgewählt aus Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

Die vorliegende Erfindung stellt vorteilhafte Multiexpressions-
5 kassetten und Konstrukte zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genkombinationen in Pflanzen zur Verfügung.

Diese können im oben beschriebenen Verfahren zur Expression von Genen, bevorzugt den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5,
10 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 beschriebenen, in Algen und Pilzen und Pflanzen, insbesondere Ölfruchtpflanzen sind bevorzugte Organismen für das Verfahren verwendet werden.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten
15 können im Verfahren in Verbindung mit den oben genannten Nukleinsäuremoleküle zur gentechnologisch Veränderung von Pflanzen verwendet werden, so dass sie schließlich zur Herstellung von besseren oder effizienteren Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien führen. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der
20 Produktion einer Feinchemikalie kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden. Unter Feinchemikalien sind im Sinne der Erfindung beispielsweise Fettsäureester, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens
25 zwei Doppelbindungen enthalten wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, zu verstehen. Weiter sind darunter zu ver-
30 stehen Verbindungen wie Vitamine beispielsweise Vitamin E, Vitamin C, Vitamin B2, Vitamin B6, Pantolacton, Carotinoide wie Astaxanthin, β -Carotin, Zeaxanthin und andere.

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme,
35 die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacyl-
40 glycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders vorteilhaft zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikroorganismen, wie den vorstehend
45 erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen,

13

beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im Verfahren verwendbar.

Die im Verfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten verwendeten Nukleinsäuresequenzen codieren für Desaturasen, die zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als sechzehn, achtzehn oder zwanzig Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet sind, wobei eine Nukleinsäure für ein Enzym codiert, das Doppelbindungen in die Δ -5-Position, in einem anderen Fall in die Δ -6-Position und in einem weiteren Fall in die Δ -12-Position einführen kann. Mithilfe dieser Nukleinsäuren können hohe Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion erhalten werden. Weiterhin wurden weitere Desaturasen isoliert, die allein oder zusammen mit einer Δ -4-Desaturase für ein Verfahren zur Produktion polyungesättigter Fettsäuren genutzt werden können. Dabei ist in der Anmeldung unter dem Singular d.h. unter einem Desaturasegen oder -Protein auch der Plural d.h. die Desaturasegen oder -Proteinen zu verstehen.

Die Herstellung einer Triensäure mit C_{18} -Kohlenstoffkette mithilfe von Desaturasen konnte bisher gezeigt werden. In diesen literaturbekannten Verfahren wurde die Herstellung von γ -Linolensäure beansprucht. Bisher konnte jedoch niemand die Herstellung sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C_{20} - und längerer Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten Typen) allein durch modifizierte Organismen zeigen.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C_{18} -Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C_{20} -Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier Elongationsrunden zu C_{22} -, C_{24} - oder C_{26} -Fettsäuren. Die in dieser Erfindung offenbarten Nukleinsäuresequenzen, die für verschiedene Desaturasen codieren, können im Konzert mit Elongasen zu sehr langkettigen, polyungesättigten führen. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C_{18} - und/oder C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül. Die Fettsäureelongation kann durch Kombination der erfindungsgemäßen Desaturasen mit einer Elongaseaktivität erfolgen, wobei die durch die in SEQ ID NO: 9 codierte Elongase vorteilhaft verwendet

14

- werden kann. Nachdem die Verlängerung mit dem erfindungsgemäßen Enzym(en) stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte wie z.B. eine solche in Δ -5-Position erfolgen. Auch die Kombination mit anderen Elongasen wie solche, die zu einer Ver-
- 5 längerung von C_{18} - auf C_{20} - oder von C_{20} - auf C_{22-24} Ketten wie in WO0012720 offenbart führt, kann Verwendung finden und/oder einer Desaturase mit Aktivität für Δ -4-Position kann vorteilhaft eingesetzt werden, um die hoch desaturierten Fettsäuren zu erhalten. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der
- 10 möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Desaturierungsgrad, wie Dihomo-gamma-Linolensäure, Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω 6-Eicosatriendihomo- γ -linolensäure, Eicosapentaensäure, ω 3-Eicosatriensäure, ω 3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der
- 15 erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure; 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, Pinolensäure, α -oder γ -Linolensäure oder Stearidonsäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure
- 20 sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Die C_{18} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungs-
- 25 gemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride oder Triacylglyceride, verlängert werden.
- 30 Für die menschliche Ernährung ist konjugierte Linolsäure "CLA" von besonderer Bedeutung. Unter CLA versteht man insbesondere Fettsäuren wie $C_{18:2}$ ⁹ cis, 11trans oder das Isomer $C_{18:2}$ ¹⁰trans, ¹² cis, die aufgrund menschlicher Enzymsysteme nach Aufnahme im Körper desaturiert bzw. elongiert werden können und zu gesundheits-
- 35 fördernden Effekten beitragen können. Mit den erfindungsgemäßen Desaturasen (Δ -12-Desaturase) können auch solche konjugierten Fettsäuren mit wenigstens zwei Doppelbindungen im Molekül desaturiert werden und damit solche gesundheitsfördernden Fettsäuren der menschlichen Ernährung zugeführt werden. Weitere
- 40 Beispiel für konjugierte Fettsäuren sind alpha-Parinarinsäure, Punicasäure, Eleostearinsäure und Calendulasäure.

Unter der Verwendung von der erfindungsgemäßen Expressionkassetten in Klonierungsvektoren in Pflanzen und bei der Pflanzentrans-

45 formation, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F.

15

White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)), lassen sich Gene vorteilhaft Biosynthesegene wie die oben beschriebenen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent beispielsweise eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines beispielsweise von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen Desaturaseproteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des Desaturaseproteins oder -Gens sowie von Genkombinationen von Desaturasen und Elongasen kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des entsprechenden Gens fehlte. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Ölspeichernden Gewebes ermöglicht.

Durch das Einbringen eines Desaturasegens oder mehrerer Desaturasegene unter Kontrolle der erfindungsgemäßen Expressionskassetten in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Zusammensetzung der Enprodukte beispielsweise der Triacylglycerine erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments er-

16

höht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PU-FAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer
5 oder mehrerer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen
10 aus Pflanzen oder Mikroorganismen zu steigern.

Die Mutagenese der/des erfindungsgemäßen Desaturasegene(s) kann weiterhin zu einem Desaturaseprotein mit geänderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter
15 Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispielsweise kann die Anzahl oder Aktivität der/des erfindungsgemäßen Desaturasegens(e) gesteigert werden, so dass die normalen Stoffwechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie
20 andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der Zelle (welche die Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Biosynthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten
25 Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen, wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer strom-
30 abwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs die Allokation der PUFA in die Triacylglycerin-Fraktion steigern, man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren.
35 Das erfindungsgemäße Desaturasegen kann auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen der verschiedenen Lipid- und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine einschneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten
40 neusynthetisierter PUFAs. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheblich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die
45 Unversehrtheit der Zelle auswirken, die beide eine entscheidende Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merk-

17

male, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stress-situationen, beeinflussen.

Im Verfahren können isolierte Nukleinsäuremoleküle (z.B. cDNAs),
5 umfassend Nukleotidsequenzen, die eine Desaturase oder mehrere Desaturasen oder biologisch aktive Teile davon codieren, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungssonden zum Nachweis oder zur Amplifikation desaturasekodierender Nukleinsäuren (z.B. DNA oder mRNA) eignen, verwendet werden. Bei
10 besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine der in Sequenz ID NO:1 bzw 3 und 5 dargestellten Nukleotidsequenzen oder die kodierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotidsequenzen. Bei anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das isolierte Nukleinsäuremolekül
15 eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotidsequenz, wie in der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist. Bei anderen
20 bevorzugten Ausführungsformen kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte Desaturasegen besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen
25 Desaturaseaktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält,
30 die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon eine Desaturaseaktivität beibehält. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau
35 von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder
40 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein Voll-längen-Protein, das im wesentlichen in Teilen homolog zu einer gesamten Amino-
45 säuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von dem in

SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leserahmen herrührt) ist.

Bei anderen Ausführungsformen umfasst die isolierte Desaturase
5 eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50 % homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann,
10 wobei desaturierte C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen gemeint ist.

Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform rührt das isolierte Nukleinsäuremolekül von *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 her
15 und kodiert ein Protein (z.B. ein Desaturasefusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NR 2, 4, 6 oder 12 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Ver-
20 bindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der Desaturierungsaktivitäten resultierend in PUFAs wie GLA, ALA, Dihomo-gamma Linolensäure, ARA, EPA oder DHA oder deren Vorläufermoleküle besitzt, und umfasst auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die
25 ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine kodieren.

Alternativ kann die isolierte Desaturase eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu
30 mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die bevorzugten Desaturaseformen ebenfalls eine der hier beschriebenen
35 Desaturaseaktivitäten besitzen.

Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15, 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang
40 und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 17 umfasst. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Stärker bevorzugt kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül
45 natürlich vorkommende *Phaeodactylum*-Desaturase oder einen biologisch aktiven Teil davon.

19

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind Expressionskassetten, die die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit den Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 in den verschiedenen Organismen wie pflanzliche Zellen, Geweben, Teilen von Pflanzen 5 oder ganzen Pflanzen ermöglichen.

Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 32 als L1 und einem Promotor, einem Strukturgen ausgewählt aus den vorteilhaft-
10 ten Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, und die Polylinker-Terminator-Polylinker-Sequenzen (= L2) SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 35 zu verstehen.
15 Diese steuern vorteilhafterweise die Genexpression in der Wirtszelle. Diese in den Konstrukten enthaltenen regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert
20 und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder an-
25 stelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut
30 sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so modifiziert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form
35 von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte
40 "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene können in einer oder mehreren
45

Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie
5 oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten
Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Ver-
stärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale
wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist
10 aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem bei-
spielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B.
rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens eine der erfin-
15 dungsgemäßen Expressionskassetten enthalten, und Wirtszellen, in
die die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder diese Vekto-
ren eingebracht worden sind, insbesondere Mikroorganismen, Pflan-
zenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Bei einer
Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Ver-
20 bindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur Isolation der ge-
wünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. Die Verbindung
(Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die Desaturase
können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflan-
zen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am
25 stärksten bevorzugt Zellen von Speichergeweben, wie Samenhüllen,
Knollen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe
isoliert werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch
30 veränderte transgene Pflanze, bevorzugt ein Ölfruchtpflanze, wie
vorstehend erwähnt, besonders bevorzugt eine Raps- oder Lein-
pflanze, in die eine erfindungsgemäße Expressionskassette, die
vorteilhaft weitere Gene wie Desaturasegen enthält, eingebracht
worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von Raps oder
35 Lein durch Einbringen einer erfindungsgemäßen Expressionskassette
vorteilhaft enthaltend weitere Nukleinsäuremoleküle, die bei-
spielsweise eine Wildtyp- oder mutierte Desaturasesequenz kodiert,
als Transgen verändert worden. Bei einer bevorzugten Ausführungs-
form wird Raps oder Lein auch zur Produktion einer gewünschten
40 Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei PUFAs besonders be-
vorzugt sind, verwendet.

Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das
Moos *Physcomitrella patens* zur Demonstration der Funktion einer
45 Expressionskassette mit einem Desaturasegen unter Verwendung

21

homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren verwendet werden.

Das Desaturasepolypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon
5 kann vorteilhaft unter Kontrolle der erfindungsgemäßen Expressionskassette funktionsfähig mit einem weiteren Polypeptid, das eine andere enzymatische Aktivität als die Desaturasen hat beispielsweise eine Elongase-, Acyltransferase- oder sonstige Aktivität verbunden werden, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird.
10 Vorteilhaft hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die sich von derjenigen der Desaturase allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsform nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die zur Synthese von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder
15 Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teil. Besonders vorteilhaft moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in einer Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung innerhalb einer und durch die Zelle. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusion-
20 sproteine auch Δ -4-, Δ -5- oder Δ -6, Δ -8-, Δ -15, Δ -17 oder Δ -19-Desaturaseaktivitäten allein oder in Kombination. Insbesondere solche Genkombinationen sind bevorzugte Ausführungsformen, die aus SEQ ID NO: 7 oder 9 gewählt sind, bzw Teilen davon, Derivate oder ihren Homologen. Insbesondere solche
25 Kombinationen sind bevorzugt, die die vollständige Proteinaktivität wie in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 enthalten und in Multiexpressionskassetten definiert durch SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16 und 17 eingefügt zur Transformation von Pflanzen und Expression in Pflanzen geeignet sind.

30

Eingehende Beschreibung der Erfindung

Ein erfindungsgemäßer Gegenstand sind auch die Expressionskassetten in Verbindung mit isolierten Nukleinsäuresequenz(en), die für
35 ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
40
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten
45 Aminosäuresequenzen erhalten werden,

22

- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Aminosäuresequenz, die durch die oben genannte(n) Nukleinsäuresequenz(en) codiert werden (für die Erfindung soll der Singular den Plural und umgekehrt umfassen). Speziell betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz codiert werden.

15

Die vorliegende Erfindung stellt Expressionskassetten bereit, die für die Expression von Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Desaturaseaktivität geeignet sind, und von Nukleinsäuren kodierend für Proteine, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Moos *Physcomitrella patens* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen wie Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

45

I. Feinchemikalien und PUFAs

23

- Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst Moleküle, die durch einen Organismus produziert worden sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie, aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-,
- 5 Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z.B. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide,
- 10 gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, Vitamins, S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids,
- 15 Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation,
- 20 Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.
- 25 Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran hat. Es kann angenommen werden, dass PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.
- 30 Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe
- 35 verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ -12-Desaturase, Δ -15-Desaturase, Δ -6-Desaturase-, Δ -5- und Δ -4-Desaturaseaktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke bei Nahrungs-
- 40 mittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.

- Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C₁₈- bzw C₂₀-Fettsäuren mehrfach
- 45 desaturiert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kodieren erste funktionell aktive Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*, einem Mikroorganismus, der PUFAs in der Triacyl-

- glycerolfraktion enthält. Mit den erfindungsgemäßen Desaturasen können Doppelbindungen in die Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Position eingeführt werden. Die Aktivitäten der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C_{18} - + C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei, 5 drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise zu C_{20} -Fettsäuren mit vorteilhaft drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der mög-
- 10 lichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C_{20} zu C_{22} -Fettsäuren, zu Fettsäuren wie Linolsäure, Docosadiensäure, dihomog-linolensäure, Arachidonsäure, ω 6-Eicosatriendihomog-linolensäure, Eicosapentaensäure, ω 3-Eicosatrien-
- 15 säure, ω 3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure, 6,9-Octadecadiensäure, Ölsäure, Linolsäure, γ -Linolensäure, Pinolensäure, α -Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte
- 20 Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure, dihomog-linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die C_{18} -oder C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder
- 25 in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Ester, verlängert werden. Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-
- 30 Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).
- 35 Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe
- 40 in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog.
- 45 Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular

25

Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

5

- Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutical wie PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höheren Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich
- 10 aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27,
- 15 S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations
- 20 in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch
- 25 aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Ver-
- 30 arbeitungshilfsstoffe. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z.B. in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde
- 35 Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literaturstellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem.
- 40 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7):229ff.

II. Elemente und Verfahren der Erfindung

- 45 Die vorliegende Erfindung beruht unter anderem auf der Entdeckung neuer Moleküle, die hier als Desaturasenukleinsäure- und -proteinmoleküle bezeichnet werden, welche eine Wirkung auf

26

die Produktion von Zellmembranen und Lipiden *Phaeodactylum tri-*
cornutum ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen
über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform
nehmen die Desaturasemoleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von
5 Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen,
notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den
Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevor-
zugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen
Desaturasemoleküle zur Regulation der Produktion von Membran-
10 komponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf
die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen
Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform
ist die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasemoleküle
moduliert, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz
15 der Produktion der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder
Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen Desaturasen regulieren,
moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen
durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder
indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der
20 Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch Mikroorganismen
und Pflanzen moduliert.

Der Begriff "Desaturase" oder "Desaturasepolypeptid" umfasst
Proteine, die an der Desaturierung von Fettsäuren teilnehmen.
25 Beispiele für Desaturasen sind in der SEQ ID NO: 1, 3, 5, 11
oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga offenbart. Die
Begriffe Desaturase oder Desaturasenukleinsäuresequenz(en)
umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine Desaturase kodieren
und bei denen ein Teil eine kodierende Region und ebenfalls
30 entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche sein
können. Beispiele für Desaturase-Gene sind die in SEQ ID NO: 1,
3, 5 oder 11 dargestellten. Die Begriffe Produktion oder
Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die
Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der
35 gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne
und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B.
kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der
Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten
Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Auf-
40 richtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie
benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-
Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz
der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die
Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt
45 als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der
Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der
gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle

27

dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für Desaturase-Moleküle codieren, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen Sequenz die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität von Desaturasen, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so dass größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen transportiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.

Die Mutagenese der genannten Nukleinsäuresequenzen kann Desaturasen mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können Desaturasen, die am Export von Abfallprodukten beteiligt

sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so dass die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die Desaturasen können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze.

30

Die genannten isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

35 Die Nukleotidsequenz der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Desaturasen sind in den SEQ ID NO: 1 bis 6 sowie 11 und 12 gezeigt. Es wurden Computeralysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizieren und/oder identifizieren, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen beteiligte Proteine bzw. der PUFA Biosynthese codieren. EST's mit der Datenbankeingabe-NO: PT001070010R und PT001078032R durch die Erfinder stellen die erfindungsgemäßen Sequenzen in SEQ ID NO: 1 und 3 dar. Die Sequenz des Fragments aus EST PT001070010R wurde ermittelt und ist wie dargestellt in SEQ ID NO: 5. Analog ist die Sequenz des Klonen PT001078032R dargestellt in SEQ ID NO: 1. Den Klonen wurden Gen-

29

namen zugewiesen. Abkürzungen bedeuten: Pp = Physcomitrella patens, Pt = Phaeodactylum tricornutum. PT001070010R aus SEQ ID NO: 5 codiert für ein neues Gen homolog zu Δ -12-Desaturase und PT001078032R codiert für eine neuartige Δ -5-Desaturase. Pt_des6
 5 kann gemäß Beispiel 5a mittels Polymerase Kettenreaktion unter Zuhilfenahme degenerierter Oligonukleotide isoliert werden. Ein so erhaltenes Fragment kann zum Sichten einer cDNA Bank aus Phaeodactylum tricornutum isoliert werden und die codierende Region einer Phaeodactylum tricornutum Δ -6-Desaturase erhalten wer-
 10 den. Ein so isoliertes Gen wird in Tabelle 1 als Pt_des6 bezeichnet und ist in SEQ ID NO: 3 dargestellt. Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen werden durch Übersetzung des genetischen Codes der Sequenz ID NO: 1, 3 und 5 erhalten und sind als SEQ ID NO: 2, 4 und 6 definiert (siehe auch Tabelle 1). Auch eine wei-
 15 tere Nukleinsäuresequenz, die für eine Δ -12-Desaturase codiert, ist Tabelle 1 zu entnehmen. Sie trägt die Klon-Nummer PT001072031R.

Tabelle 1

20

	Genname	Klonname	Nukleinsäure SEQ ID NO:	Polypeptid SEQ ID NO:
D5 Desaturase	Pt_des5	PT001078032R	1	2
D6 Desaturase	Pt_des6	Pt_des6	3	4
25 D12 Desaturase	Pt_des12	PT001070010R	5	6
D6 Desaturase	Pp_des6	Pp_des6	7	8
D6 Elongase	Pp_PSE1	PP001019019F	9	10
Δ 12 Desaturase	Pt_des12.2	PT001072013R	11	12

30 Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, 4, 6 oder 12 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu min-
 35 destens etwa 50 % homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z.B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker
 40 bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

45 Die Desaturasen oder der biologisch aktive Teile oder Fragmente davon können am Stoffwechsel von Lipiden zum Aufbau von Zellmembranen oder Speicherlipiden in Organismen teilnehmen und in Kom-

30

ination mit weiteren Genen, insbesondere solchen mit Elongaseaktivität zur Elongation von C₁₈-bzw C₂₀₋₂₂-PUFAs benötigten Aktivitäten beitragen, so dass C₁₈, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden.

5

Dabei können die Desaturasen in Kombination mit Elongasen und anderen Desaturasen in erfindungsgemäßen Expressionskassetten kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

10

Verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

15

Eine Ausführungsform der Erfindung sind isolierte Nukleinsäuren, die von PUFA produzierenden Mikroorganismen stammen und für Polypeptide kodieren, die C₁₈-oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuren mit mindestens einer, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure

20 desaturieren.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform sind isolierte Nukleinsäuren, umfassend Nukleotidsequenzen, die für Polypeptide kodieren, die C₁₈-bzw C₂₀-Fettsäuren mit mindestens ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure desaturieren und sind aus der Gruppe, bestehend aus

25

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,

30

b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,

35

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

40

45

31

Die oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäure stammt von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von *Phaeodactylum tricornutum* oder nah verwandten Organismen.

- 5 Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Expressionskassetten sowie Nukleinsäuremoleküle, die Desaturase-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente von diesen, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder
- 10 Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure (z.B. Desaturase-DNA) ausreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt
- 15 werden, umfassen. Dieser Begriff umfasst zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20
- 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen
- 30 kann das isolierte Desaturase-Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z.B. eine *Physcomitrella patens*-Zelle)
- 35 flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert
- 40 wird.

- Ein erfindungsgemäße Expressionskassette mit der Struktur SEQ ID NO: 32 -Promotor- SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuremolekül, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 oder eines Teils davon, kann unter
- 45 Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann

32

mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Beispielsweise kann aus einer *Phaeodactylum tricornutum* cDNA aus einer *Phaeodactylum tri-*
5 *cornutum*-Bank isoliert werden, indem die vollständige SEQ ID NO:1, 3, 5 oder 11 oder ein Teil davon als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Labo-
10 ratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen
15 davon, insbesondere Regionen um Motive aus Beispiel 5a erstellt werden oder Modifikationen ebensolcher in einzelnen definierten Aminosäuren, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz der SEQ ID NO:1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Ver-
20 wendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) und cDNA
25 mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich
30 auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 sowie der in Figur 5a gezeigten Sequenzen oder mithilfe der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten
35 Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-
40 Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Die in SEQ ID NO: 1,3, 5 oder 11 gezeigte cDNA umfasst Sequenzen, die Desaturasen kodieren, (d.h. den "kodierenden Bereich") sowie
45 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den kodierenden Bereich einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 um-

33

fassen oder kann ganze genomische Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein
5 erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist dann
10 ausreichend komplementär, wenn es mit einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Homologe der neuen Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der
15 Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder
20 mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein isoliertes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11
25 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenz
30 erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen
35 nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 kodierten Protein.

40 Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

45 Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch

einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch 5 Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur 10 einen Teil des kodierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer Desaturase kodiert. Die aus der Klonierung des Desaturase-Gens 15 von *Phaeodactylum tricornutum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von Desaturase-Homologen in anderen Zelltypen und Organismen sowie Desaturase-Homologen aus anderen Mikroalgen oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der 20 Primer umfasst gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfasst gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer 25 der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologen, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 30 oder 11 können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von Desaturase-Homologen verwendet werden. Sonden auf der Basis der Desaturase-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine kodieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen 35 umfasst die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, die eine Desaturase misexprimieren, beispielsweise durch Messen 40 einer Menge einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, z.B. Messen der Desaturase-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches Desaturase-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

45 Bei einer Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausreichend homolog zu einer

35

- Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z.B. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 aufweisen, so dass das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Feinchemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer Desaturase" entweder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei. Beispiele für Desaturase-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle 5 und 6 angegeben.
- Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Die Homologie der Aminosäuresequenz kann über den gesamten Sequenzbereich mit dem Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989:151-153) oder BESTFIT oder GAP bestimmt (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.)
- Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Teile einer der Desaturasen. Wie hier verwendet, soll der Begriff "biologisch aktiver Teil einer Desaturase", einen Abschnitt, z.B. eine Domäne/ein Motiv, einer Desaturase umfassen, der am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann

oder eine in Tabelle 5 und 6 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine Desaturase oder ein biologisch aktiver Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispielteils beschrieben, sind dem Fachmann geläufig.

- 10 Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer Desaturase kodieren, lassen sich durch Isolierung eines Teils einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11, Exprimieren des kodierten Abschnitts der Desaturase oder des Peptids (z.B. durch rekombinante Expression in vitro)
- 15 und Bestimmen der Aktivität des kodierten Teils der Desaturase oder des Peptids herstellen.

Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Desaturase kodieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit einer in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert. Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Vollängen-Desaturase-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von einem in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leseraster kodiert wird) im wesentlichen homolog ist und durch gängige Methoden identifizierbar und isolierbar ist.

- Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten
- 35 Desaturase-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Desaturasen führen, innerhalb einer Population (z.B. der *Phaeodactylum tricornutum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Desaturase-Gen können
 - 40 zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leseraster, der eine Desaturase, vorzugsweise eine *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase, kodiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis
 - 45 5 % in der Nukleotidsequenz des Desaturase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende

37

Aminosäurepolymorphismen in der Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von Desaturasen nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

- 5 Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht-Phaeodactylum tricornutum-Homologen, -Derivate und -Analoge der Phaeodactylum tricornutum-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der hier offenbarten Phaeodactylum
- 10 tricornutum-Desaturase-Nukleinsäure unter Verwendung der Phaeodactylum tricornutum-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes
- 15 Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, 3, 5 oder 11 umfasst. Bei anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. Der Begriff "hybridisiert
- 20 unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, 25 stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989),
- 30 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C.
- 35 Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen
- 40 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im oben genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind
- 45 die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-

- Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 %
- 5 in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985,
- 10 "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.
- 15 Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-
- 20 Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z.B. ein natürliches Protein kodiert). Bei einer Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommendes Phyaeodactylum tricornutum-Desaturase.
- 25 Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der Desaturasesequenz, die in der Population existieren können, erkennt der Fachmann ferner, dass auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 eingebracht werden können, was zu Änderungen der Aminosäuresequenz der
- 30 kodierten Desaturase führt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des Desaturaseproteins beeinträchtigt wird. Beispielsweise lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 herstellen. Ein "nicht-
- 35 essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in einer Wildtyp-Desaturasequenz einer der Desaturasen (SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12) verändern lässt, ohne dass die Aktivität der Desaturase verändert das heißt wesentlich reduziert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die Desaturaseaktivität
- 40 erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z.B. diejenigen, die in der Domäne mit Desaturaseaktivität nicht konserviert oder lediglich semikonserviert sind) können jedoch für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit verändern, ohne dass die Desaturaseaktivität verändert wird.

Folglich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die Desaturasen kodieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die Desaturaseaktivität nicht essentiell sind. Diese Desaturasen unterscheiden sich in der

5 Aminosäuresequenz von einer Sequenz in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und behalten dennoch zumindest eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfasst bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens

10 etwa 50 % Homologie zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 umfasst und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein ist

15 vorzugsweise mindestens etwa 50 bis 60 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 stärker bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % homolog zu einer

20 der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder

25 12 und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein opti-

30 males Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12) durch den

35 gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z.B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier ver-

40 wendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).

45 Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Desaturase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Desaturase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Desaturase-kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Desaturase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die Desaturaseaktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.

Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen Desaturasen kodieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein kodiert, komplementär ist, z.B. komplementär zum kodierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz.

41

- Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten Desaturase-kodierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer
- 5 Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die eine Desaturase kodiert. Der Begriff "kodierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfasst, die in Aminosäurereste translatiert werden
- 10 (z.B. den gesamten kodierenden Bereich, der mit dem Stopcodon beginnt und endet, d.h. dem letzten Codon vor dem Stopcodon). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die Desaturase
- 15 kodiert. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den kodierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die man auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).
- 20 Unter Voraussetzung der hier offenbarten Desaturase-kodierenden Sequenzen des kodierenden Stranges (z.B. die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann
- 25 komplementär zum gesamten kodierenden Bereich von Desaturase-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichs von Desaturase-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z.B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von
- 30 Desaturase-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter
- 35 Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z.B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z.B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen
- 40 oder die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet
- 45 werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-

- thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 5 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Desaturaseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 10 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, 15 die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).
- 20 Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so dass sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine Desaturase kodiert, hybridisieren oder daran binden, um dadurch die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der 25 Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z.B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplexes bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen.
- 30 Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, dass es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z.B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen 35 bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines 40 starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promotors befindet, bevorzugt.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein 45 α -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier

et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 5 215:327-330) umfassen.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige
10 Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammer-head-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von Desaturase-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von
15 Desaturase-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 offenbarten Desaturase-cDNA (d.h. oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehrteten Verfahren zu isolierenden heterologen
20 Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer Desaturase-kodierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z.B. Cech et al., US-Patent Nr. 4,987,071 und Cech
25 et al., US-Patent Nr. 5,116,742. Alternativ kann Desaturase-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418.

30 Alternativ lässt sich die Desaturase-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer Desaturase-Nukleotidsequenz (z.B. einem Desaturase-Promotor und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, dass
35 Dreifachhelix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines Desaturase-Gens in Zielzellen hemmen. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815.

40

B. Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt, -fragment oder Expressionskassette)

Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette sind die in
45 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate

zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche vorteilhaft die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen

5 Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt

10 es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen

15 noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder

20 dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit

25 Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression

30 der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette

35 (= Genkonstrukt) enthalten sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Ver-

40 stärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

45

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch Seq ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 definiert sind und gem. SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 12 Polypeptide kodieren. Dabei
5 stammen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 und 11 von Desaturasen während SEQ ID NO: 9 für eine Elongase codiert. Desaturasen codierende Enzyme, die eine Doppelbindung in Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Position einführen, wobei das Substrat ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen aufweisen. Die in SEQ ID NO: 9 dargestellte Sequenz
10 codiert für eine Enzymaktivität, die eine Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert sowie ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind. Beispiele für diese Regula-
15 tionssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch modifiziert
20 worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und die Expression der Gene gesteigert worden ist. Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d.h. dass keine zusätzlichen Regulationssignale vor der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder ihren Homologen inseriert worden
25 sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht deletiert worden ist. Statt dessen ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, dass keine Regulation mehr stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte
30 Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden sind und die gesteigerte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die
35 Desaturasegene und das Elongasegen können im Genkonstrukt in einer oder mehreren Kopien vorliegen. Sie können in einem Genkonstrukt oder mehreren Genkonstrukten vorliegen. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder
40 die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

45 Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-,

- ara-, SP6-, λ -P_R- oder λ -P_L-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetra-cyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4- (Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2) (2):233-239), DC3 (Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368), Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2):233-239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.
- Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.
- Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene,

- wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen
- 5 Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des
- 10 Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym, A-Oxidase(n),
- 15 Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipooxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet.

- Genkonstrukte umfassen vorteilhafterweise zur Expression der
- 20 anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden. Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die
- 25 spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, dass das Gen nur nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.
- 30 Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die Expression der eingebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Regulationselemente unter Verwendung
- 35 starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstärkt werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

40 C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die eine Desaturase allein (oder einen Teil davon) oder ein
- 45 unter Punkt b beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in dem die erfindungsgemäße Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels

- wie Desaturasasen oder Elongasen enthalten ist. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (z.B. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.
- Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und

andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder
5 siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des
10 gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen, die von den Nukleinsäuren, wie hier beschrieben, kodiert werden (z.B. Desaturasen, mutante Formen von
15 Desaturasen, Fusionsproteine usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von Desaturasen und Elongasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können
25 Desaturasegene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991)
30 "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428; Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics
35 of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology.1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramoecium, Colpidium, Glaucocystis, Platyophrya, Potamogeton, Desaturase-
40 udocohnilembus, Euplotes, Engelmanniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated
45 transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7,

S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) oder Säugerzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin kodiertes Protein an, gewöhnlich am Aminoterminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so dass die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die Desaturase-kodierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so dass ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein kodiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-Spaltstelle-X-Protein umfasst. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante Desaturase, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

- Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.
- Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M13mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹³-B1, λ gt11 or pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667. Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so dass die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.
- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Desaturase-Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi,

J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, 5 YEp13 oder pEMBLye23.

Alternativ können die erfindungsgemäßen Desaturasen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von 10 Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

15 Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

20

Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines Säuger-Expressionsvektors exprimiert. Unter Säugern werden im Sinne der Erfindung alle nicht-humanen Säuger verstanden.

25 Beispiele für Säuger-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Bei der Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete 30 Promotoren stammen z.B. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring 35 Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säuger-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in 40 einem bestimmten Zelltyp steuern (z.B. werden gewebespezifische Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren sind u.a. der Albuminpromotor (leberspezifisch; 45 Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), lymphoidspezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und

53

Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33:741-748), neuronspezifische Promotoren (z.B. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477), pankreas-
 5 spezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230:912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (z.B. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4,873,316 und Europäische Patentanmeldung-Veröffentlichung Nr. 264,166). Auch entwicklungsregulierte Promotoren sind umfasst, z.B. die hox-Promotoren
 10 der Maus (Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379) und der Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen
 15 Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren
 20 umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation",
 25 Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

30 Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevor-
 35 zugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-t-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren
 40 sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie
 45 Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaik-

virus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem
5 geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf
rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt.
Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression
herbeiführen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie
diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck
10 et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605
und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028
beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktions-
15 fähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind
Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein
entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Über-
sicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423
und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die
20 Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amylo-
plasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum,
die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper,
Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

25 Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch
induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz
1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108).
Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn
gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise
30 erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-
induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzier-
barer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein
Ethanol-induzierbarer Promotor.

35 Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stress-
bedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise
der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant.
Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-
Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-
40 amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch
Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die
Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen
45 die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie
den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos.
Geeignete Promotoren sind der Nappingen-Promotor aus Raps

55

(US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression von erfindungsgemäßen Desaturasen allein oder in Kombination mit anderen Desaturasen oder Elongasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. d.h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden, dass die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur Desaturase-mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulationssequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können virale Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt werden, welche die konstitutive, gewebespezifische

oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H., et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht nur die bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

Unter Rekombinant oder Transgen beispielsweise rekombinanten Expressionsvektor oder rekombinanten Wirt oder Wirtszellen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder deren natürliche Regulationssequenzen an 5' und 3'-Position der Nukleinsäuren nicht in ihrer natürlichen Umgebung sind, das heißt entweder wurde die Lage der Sequenzen im Herkunftstorganismus verändert oder in diesem wurden die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Regulationssequenzen mutiert oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen wurden in einen anderen Organismus als den Herkunftstorganismus verbracht oder deren Regulationssequenzen. Auch Kombinationen dieser Veränderungen sind möglich. Unter natürlicher Umgebung ist die Lage einer Nukleinsäuresequenz in einem Organismus zu verstehen, wie er in der Natur vorkommt.

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine Desaturase in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

- Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine
- 5 Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coppräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektro-
- 10 poration oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
- 15 Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 20 Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt, dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektier-
- 25 baren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein
- 30 Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie β -Galactosidase, ura3 oder ilv2. Marker, welche Gene, wie Luziferase, gfp oder andere Fluoreszenzgene
- 35 kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirts-
- 40 zelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der eine Desaturase kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. überleben
- 45 Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines Desaturasegens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das Desaturasegen zu verändern, z.B. funktionell zu disrumpieren. Dieses Desaturasegen ist vorzugsweise ein *Phaeodactylum tricornutum* Desaturasegen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus anderen Organismen, sogar aus einer Säuger-, Pilz- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination funktionell disrumpiert wird (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein kodiert, auch als Knock-out-Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet sein, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein kodiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, dass dadurch die Expression der endogenen Desaturase verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als Chimeraplasty bekannte DNA-RNA-Hybride verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 und Kmiec, *Gene therapy*, 1999, *American Scientist*, 87(3):240-247 bekannt sind.

Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des Desaturasegens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des Desaturasegens flankiert, so dass homologe Rekombination zwischen dem exogenen Desaturasegen, das auf dem Vektor vorliegt, und einem endogenen Desaturasegen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende Desaturase-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten (eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z.B. in Thomas, K.R., und Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51:503 oder der Rekombination in *Physcomitrella patens* auf cDNA-Basis in Strepp et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (8):4368-4373). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z.B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte Desaturasegen mit dem endogenen Desaturasegen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

- Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines Desaturasegens in einem
- 5 Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, ermöglicht z.B. die Expression des Desaturasegens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.
- 10 Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, kann zur Produktion (d.h. Expression) einer Desaturase verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über
- 15 Elektroporation oder Gentransfer mittels Agrobacterium angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren zur Produktion von Desaturasen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfasst das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die
- 20 ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Desaturase kodiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte Desaturase kodiert) in einem geeigneten Medium, bis die Desaturase produziert worden ist. Das Verfahren umfasst bei einer weiteren Ausführungsform das
- 25 Isolieren der Desaturasen aus dem Medium oder der Wirtszelle.

- Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle
- 30 prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien, Pilze, Hefen, Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise ver-
- 35 wendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Canola, Erdnuss, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis,
- 40 Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind
- 45 Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

D. Isolierte Desaturase

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Desaturasen und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder "ge-
5 reinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material"
10 umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfasst der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf
15 das Trockengewicht) nicht-Desaturase (hier auch als "verunreinigendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % nicht-Desaturase, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % nicht-Desaturase und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % nicht-Desaturase. Wenn die Desaturase oder ein biologisch
20 aktiver Teil davon rekombinant hergestellt worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20 %, stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von
25 chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfasst der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder
30 anderen Chemikalien" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trockengewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % chemischen Vorstufen
35 oder nicht-Desaturase-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen isolierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine verunreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die
40 Desaturase stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase in Pflanzen wie *Physcomitrella patens* bzw. o.g. oder Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, Pilzen, wie *Mortierella*, Hefe,
45 wie *Saccharomyces*, oder Ciliaten wie *Colpidium* oder Algen wie *Phaeodactylum* hergestellt.

61

Eine erfindungsgemäße isolierte Desaturase oder ein Teil davon kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Bei 5 bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* not- 10 wendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße Desaturase eine der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 15 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert. Bei noch einer weiteren 20 bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96 %, 25 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 18 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten. Zum Beispiel umfasst eine erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase eine Amino- 30 säuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tri-* *cornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen 35 über diese Membranen teilnehmen kann oder eine Doppelbindung in eine Fettsäure mit ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen und einer Kettenlänge von C₁₈, C₂₀ oder C₂₂ einführt.

Bei anderen Ausführungsformen ist die Desaturase im wesentlichen 40 homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 bei, ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. 45 Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Desaturase folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und

stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist und zumindest eine der

5 hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein vollständiges *Phaeodactylum tricornutum*-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist.

10

Biologisch aktive Teile einer Desaturase umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer Desaturase hergeleitet sind, z.B. eine in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz

15 eines Proteins, das zu einer Desaturase homolog ist, welche weniger Aminosäuren als die Vollängen-Desaturase oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer Desaturase homolog ist, und zumindest eine Aktivität einer Desaturase aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z.B.

20 Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer Desaturase. Überdies können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante

25 Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer Desaturase umfassen vorzugsweise ein/eine oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.

30

Desaturasen werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein kodierendes Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine

35 Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die Desaturase wird in der Wirtszelle exprimiert. Die Desaturase kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine Desaturase, ein

40 -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native Desaturase aus Zellen (z.B. Endothelzellen) z.B. unter Verwendung eines Anti-Desaturase-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungs-

45 gemäßige Desaturase oder ein Fragment davon verwendet wird.

63

Die Erfindung stellt auch chimäre Desaturase-Proteine oder Desaturase-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfasst ein "chimäres Desaturase-Protein" oder "Desaturase-Fusionsprotein" ein Desaturase-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-Desaturase-Polypeptid gebunden ist. Ein "Desaturase-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einer Desaturase entspricht, wohingegen ein "nicht-Desaturase-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der Desaturase ist, z.B. ein Protein, das sich vom der Desaturase unterscheidet und aus dem gleichen oder einem anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, dass das Desaturase-Polypeptid und das nicht-Desaturase-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen. Das nicht-Desaturase-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des Desaturase-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel ein GST-Desaturase-Fusionsprotein, bei dem die Desaturase-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinanten Desaturasen erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein eine Desaturase, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer Desaturase durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

Ein erfindungsgemäßes chimäres Desaturase-Protein oder Desaturase-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen kodieren, gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden können, so dass eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel Current Protocols in Molecular

Biology, Hrsgb. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionsseinheit (z.B. ein GST-Polypeptid) kodieren. Eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann in einen solchen
5 Expressionsvektor kloniert werden, so dass die Fusionsseinheit im Leseraster mit dem Desaturase-Protein verbunden ist.

Homologe der Desaturase können durch Mutagenese, z.B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der Desaturase, erzeugt
10 werden. Der Begriff "Homologe", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der Desaturase, die als Agonist oder Antagonist der Desaturase-Aktivität wirkt. Ein Agonist der Desaturase kann im wesentlichen die gleiche Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der Desaturase beibehalten. Ein
15 Antagonist der Desaturase kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der Desaturase durch zum Beispiel kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zellmembrankomponenten, welche die Desaturase umfasst, oder durch Bindung an eine
20 Desaturase, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.

Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologe der Desaturase durch Sichten kombinatorischer Banken von Mutanten,
25 z.B. Verkürzungsmutanten, der Desaturase hinsichtlich Desaturase-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Ausführungsform wird eine variierte Bank von Desaturase-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und durch eine variierte Genbank kodiert. Eine
30 variierte Bank von Desaturase-Varianten kann z.B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so dass sich ein degenerierter Satz potentieller Desaturase-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer
35 Fusionsproteine (z.B. für das Phage-Display), die diesen Satz von Desaturase-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Desaturase-Homologen aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische
40 Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz
45 an potentiellen Desaturase-Sequenzen kodieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (siehe z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron

39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

- 5 Zusätzlich können Banken von Desaturase-Fragmenten zur Herstellung einer variierten Population von Desaturase-Fragmenten für das Sichten und für die anschließende Selektion von Homologen einer Desaturase verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten der kodierenden Sequenz durch
10 Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Desaturase-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, welche Sense/Antisense-Paare von
15 verschiedenen Produkten mit Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden,
20 die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente der Desaturase verschiedener Größen kodiert.

- Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Sichten von Genprodukten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen
25 oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Sichten von cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Sichtung der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von Desaturase-Homologen erzeugt worden sind. Die am häufigsten
30 verwendeten Techniken zum Sichtung großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterworfen werden können, umfassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen
35 Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination mit den
40 Sichtungstests zur Identifikation von Desaturase-Homologen verwendet werden (Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

- 45 Eine weitere bekannte Technik zur Veränderung von katalytischen Eigenschaften von Enzymen bzw. deren codierenden Genen ist das "Gen-Shuffling" (siehe z.B. in Stemmer, PNAS 1994, 91:

10747-10751, WO9720078 oder WO9813487), das eine Kombination von Genfragmenten darstellt, wobei diese Neukombination zusätzlich noch durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktionen variiert werden kann und somit eine hohe zu testende Sequenzdiversität schafft.

- 5 Voraussetzung für den Einsatz eines solchen Ansatzes ist jedoch ein geeignetes Screeningsystem, um die erstellte Gendiversität auf Funktionalität zu überprüfen.

- Insbesondere für die Sichtung von Desaturaseaktivitäten
- 10 ist ein Sichtungsverfahren Voraussetzung, das PUFA-abhängig Enzymaktivität(en) erfaßt. Bzgl. Desaturaseaktivitäten mit Spezifität für PUFAs kann man in *Mucor*-Species, die durch bekannte Transformationsverfahren mit gewünschten Genkonstrukten transformierbar sind, die Toxizität von Arachidonsäure in An-
- 15 wesenheit eines toxischen Metaboliten (hier: Salicylsäure oder Salicylsäurederivate) nutzen (Eroshin et al., *Mikrobiologiya*, Vol. 65, No.1 1996, Seiten 31-36), um eine wachstumsbasierte Erstsichtung durchzuführen. Resultierende Klone können dann einer Analyse ihrer Lipidinhaltstoffe mittels Gaschromatographie und
- 20 Massenspektroskopie unterzogen werden, um Edukte und Produkte in Art und Menge zu erfassen.

- Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis zur Analyse einer variierten Desaturase-Bank unter Verwendung
- 25 von weiteren im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

E. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

- Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Protein-
- 30 homologen, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *Phaeodactylum* und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit *Phaeodactylum tricornutum* verwandt sind, Identifikation und
- 35 Lokalisierung von *Phaeodactylum tricornutum*-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von Desaturase-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer Desaturase-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder mehrerer Zellmembrankomponenten; Modulation des Transmembran-
- 40 transports einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Phaeodactylum*
- 45 *tricornutum* oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des Vorliegens von *Phaeodactylum tricornutum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation

- von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *Phaeodactylum tricornutum*-Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von
- 5 Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *Phaeodactylum tricornutum* -Gens oder von Teilen davon überspannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. *Phaeodactylum tricornutum* selbst werden zur kommerziellen Produktion
- 10 mehrfach ungesättigter Säuren verwendet und eignen darüber hinaus zur PUFA-Produktion auch in anderen Organismen insbesondere wenn erreicht werden soll, dass resultierende PUFAs auch in die Triacylglycerolfraktion eingebaut werden sollen.
- 15 Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle *Phaeodactylum tricornutum*-Proteinen geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes DNA-
- 20 bindendes Protein von *Phaeodactylum tricornutum* bindet, könnte das *Phaeodactylum tricornutum*-Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht
- 25 nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von *Phaeodactylum tricornutum* und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der
- 30 Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, dass diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte bei verwandten Pilzen oder Algen dienen können.
- 35 Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen
- 40 prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen kodieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich
- 45 die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind.

Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteinengineering-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

5

Die Manipulation der erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle kann zur Produktion von Desaturasen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-Desaturasen führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können
10 in größeren Anzahlen als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Verbesserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, dass das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10 % höhere, besonders bevorzugt eine
15 mindestens 20 % höhere Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30 % höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym aufweist.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung
20 einer erfindungsgemäßen Desaturase die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifi-
25 kant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die Reinigung verbessern, wenn die Zelle in vivo Verbindungen in einem speziali-
30 sierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die Desaturasen exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Fein-
35 chemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien
40 sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren,
45 Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosynthese-

prozess verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturase-Gene kann ebenfalls zu Desaturasen mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder Pilzen indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z.B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies), die diese Stoffwechselprozesse aktiv stören können (z.B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2);226-235)). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich. Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann tatsächlich für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

Die erfindungsgemäßen Desaturasen können ferner so manipuliert sein, dass die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen

der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten
5 können. Durch Manipulieren von Desaturasen, die an der Produktion von Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so dass die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen
10 empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen überleben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

15

Die vorstehend genannten Mutagenese Strategien für Desaturasen, die zu erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser
20 Mechanismen und mithilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte Desaturase-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle expri-
25 mieren, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder Bakterien sein, welches die Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte
30 natürlich vorkommender Stoffwechselwege umfasst, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfindungsgemäßen Zellen produziert werden.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren
35 zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor umfasst, welche ein Polypeptid kodieren, das C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im
40 Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen, unter denen PUFAs in dem Organismus produziert werden, verlängert, umfasst. Durch dieses Verfahren hergestellte PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen
45 und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glyco-

71

- lipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem
- 5 Gehalt an PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs bedeutet mindestens 5 %, vorzugsweise 10 %, besonders bevorzugt 20 %, ganz besonders bevorzugt 40 % mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus, der keine zusätzliche Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Desaturase kodiert, besitzt.
- 10 Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, bei Kombination mit einer weiteren Elongasen und einer Δ -4 Desaturase
- 15 fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.
- 20 Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von
- 25 transgenen Pflanzen herrühren.
- Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 30 Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Desaturasen, umfassend
- 35 a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
- b) Testen der Desaturaseaktivität;
- 40 c) Vergleichen der Desaturaseaktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der Desaturaseaktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und eine Verringerung
- 45 der Desaturaseaktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist.

- Der genannte Kandidatenstoff kann ein chemisch synthetisierter oder mikrobiologisch produzierter Stoff sein und z.B. in Zell-extrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Weiterhin kann der genannte Stoff zwar im Stand der
- 5 Technik bekannt sein, aber bisher nicht bekannt sein als die Aktivität der Desaturasen steigernd oder reprimierend. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die
- 10 genannten Stoffe können z.B. zu dem Reaktionsgemisch oder dem Kulturmedium zugegeben werden oder den Zellen injiziert werden oder auf eine Pflanze gesprüht werden.
- 15 Wenn eine Probe, die ein nach der erfindungsgemäßen Methode aktiven Stoff beinhaltet, identifiziert wurde, dann ist es entweder möglich, den Stoff direkt von der ursprünglichen Probe zu isolieren oder man kann die Probe in verschiedene Gruppen teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten
- 20 besteht, um so die Zahl der verschiedenen Substanzen pro Probe zu reduzieren und dann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer solchen "Unterprobe" der ursprünglichen Probe zu wiederholen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die
- 25 gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Probe nur noch eine geringe Anzahl von Substanzen oder nur noch eine Substanz umfaßt. Vorzugsweise wird der gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Stoff oder Derivate davon weiter formuliert, so, daß er für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung oder Pflanzen-
- 30 zell- oder Gewebekultur geeignet ist.

- Die Stoffe, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert wurden, können sein: Expressionsbibliotheken, z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder
- 35 ähnliches (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen). Diese Stoffe können auch funktionelle Derivate oder Analogon der bekannten Inhibitoren oder Aktivatoren
- 40 sein. Verfahren zur Herstellung von chemischen Derivaten oder Analogon sind dem Fachmann bekannt. Die genannten Derivate und Analogon können gemäß Verfahren nach dem Stand der Technik getestet werden. Weiterhin kann computergestütztes Design oder Peptidomimetics zur Herstellung geeigneter Derivate und Analogon
- 45 verwendet werden. Die Zelle oder das Gewebe, die/das für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kann, ist vorzugsweise eine erfindungsgemäße Wirtszelle, Pflanzenzelle oder ein

Pflanzengewebe, wie in den oben genannten Ausführungsformen beschrieben.

Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch einen
5 Stoff, der gemäß den vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren
identifiziert wurde. Der Stoff ist z.B. ein Homolog der
erfindungsgemäßen Desaturasen. Homologe der Desaturasen können
durch Mutagenese, z.B. durch Punktmutation oder Deletion der
Desaturasen, erzeugt werden. Hierin verwendet wird der Begriff
10 "Homolog" als eine variante Form der Desaturasen, die als Agonist
oder Antagonist für die Aktivität der Desaturasen wirkt. Ein
Agonist kann die im wesentlichen gleiche oder einen Teil der
biologischen Aktivität der Desaturasen haben. Ein Antagonist der
Desaturasen kann eine oder mehr Aktivitäten der natürlich vor-
15 kommenden Formen der Desaturasen inhibieren, z.B. kompetitiv an
ein *Downstream* oder *Upstream* gelegenes Mitglied der Fettsäure-
synthese-Stoffwechselwege, die die Desaturasen einschließen,
binden oder an Desaturasen binden und dabei die Aktivität
reduzieren oder inhibieren.

20 Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Antikörper
oder ein Fragment davon, wie sie hierin beschrieben werden, der
die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen inhibiert.

25 Bei einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Anti-
körper, der spezifisch den erfindungsgemäßen oben beschriebenen
Agonisten oder Antagonisten erkennt bzw. bindet.

Ein weiterer Aspekt betrifft eine Zusammensetzung, die den Anti-
30 körper, den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten
Stopp oder das Antisense-Molekül umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung ein Kit, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäure,
35 das erfindungsgemäße Genkonstrukt, die erfindungsgemäße Amino-
säuresequenz, das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül,
den erfindungsgemäßen Antikörper und/oder Zusammensetzung, einen
Antagonisten oder Agonisten, der nach dem erfindungsgemäßen Ver-
fahren hergestellt wurde, und/oder erfindungsgemäße Öle, Lipide
40 und/oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon. Ebenso kann das
Kit die erfindungsgemäßen Wirtszellen, Organismen, Pflanzen
oder Teile davon, erntbare Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen
oder Vermehrungsmaterial oder aber auch den erfindungsgemäßen
Antagonisten oder Agonisten umfassen. Die Komponenten des Kits
45 der vorliegenden Erfindung können in geeigneten Containern, bei-
spielsweise mit oder in Puffern oder anderen Lösungen verpackt
sein. Ein oder mehr der genannten Komponenten können in ein und

demselben Container verpackt sein. Zusätzlich oder alternativ können ein oder mehr der genannten Komponenten z.B. auf einer festen Oberfläche adsorbiert sein, z.B. Nitrozellulosefilter, Glasplatten, Chips, Nylonmembranen oder Mikrotiterplatten. Das
5 Kit kann für jede der hierin beschriebenen Methoden und Ausführungsformen verwendet werden, z.B. für die Produktion von Wirtszellen, transgenen Pflanzen, zur Detektion von homologen Sequenzen, zur Identifikation von Antagonisten oder Agonisten usw. Weiterhin kann das Kit Anleitungen für die Verwendung des
10 Kits für eine der genannten Anwendungen enthalten.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung
15 zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispielteil

20

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

25 Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli- und Hefe-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse
30 rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3). Die Transformation und Anzucht von Algen,
35 wie Chlorella oder Phaeodactylum werden durchgeführt wie beschrieben von El-Sheekh (1999), Biologia Plantarum 42:209-216; Apt et al. (1996) Molecular and General Genetics 252 (5):872-9.

b) Chemikalien

40

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung
45 von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendo-

75

nukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/ Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

10

c) Zellmaterial

Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

Phaeodactylum tricornutum wurde bei 25°C mit einem Licht/Dunkel Rhythmus von 14:10 Stunden bei 22°C und 35 microEinstein (entspricht micromol Photonen pro Quadratmeter und Sekunde) in Glasröhren kultiviert, die von unten mit Luft begast wurden.

Als Kulturmedium für *Phaeodactylum tricornutum* wurde das f/2 Kulturmedium mit 10 % organischen Medium nach Guillard, R.R.L. verwendet (1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (Eds.) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60.): Es enthält

30 995,5 ml Seewasser (artifizuell)

1 ml NaNO₃ (75 g/l), 1 ml NaH₂PO₄ (5 g/l), 1 ml Spurenelementelösung, 1 ml Tris/Cl pH 8.0, 0.5 ml f/2 Vitaminlösung

Spurenelementelösung: Na₂EDTA (4,36 g/l), FeCl₃ (3,15 g/l),

35 Primäre Spurenelemente: CuSO₄ (10 g/l), ZnSO₄ (22 g/l), CoCl₂ (10 g/l), MnCl₂ (18 g/l), NaMoO₄ (6,3 g/l)

f/2 Vitaminlösung: Biotin: 10 mg/l, Thiamin 200 mg/l, Vit B12 0,1 mg/l

org-Medium: Na-Acetat (1 g/l), Glucose (6 g/l), Na-Succinat (3 g/l), Bacto-Trypton (4 g/l), Hefe-Extrakt (2 g/l)

76

Beispiel: 2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 für Hybridisierungsexperimente

Die Einzelheiten der Isolierung von Gesamt-DNA betreffen die Auf-
5 arbeitung von Pflanzenmaterial mit einem Frischgewicht von einem Gramm.

CTAB-Puffer: 2 % (Gew./Vol.) N-Acetyl-N,N,N-trimethylammonium-
bromid (CTAB); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA.

10

N-Laurylsarkosin-Puffer: 10 % (Gew./Vol.) N-Laurylsarkosin;
100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA.

Phaeodactylum tricornutum-Zellmaterial wurde unter flüssigem
15 Stickstoff in einem Mörser verrieben, so dass ein feines Pulver erhalten wurde, und in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde dann mit einer Schicht von 1 ml Zersetzungspuffer (1 ml CTAB-Puffer, 100 ml N-Laurylsarkosin-Puffer, 20 ml β -Mercaptoethanol und 10 ml Proteinase K-Lösung,
20 10 mg/ml) überschichtet und eine Stunde unter kontinuierlichem Schütteln bei 60°C inkubiert. Das erhaltene Homogenat wurde in zwei Eppendorfgefäße (2 ml) aufgeteilt und zweimal durch Schütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Phasentrennung wurde eine Zentrifugation
25 bei 8000 x g und RT (= Raumtemperatur = ~ 23°C) jeweils 15 min lang durchgeführt. Die DNA wurde dann 30 min unter Verwendung von eiskaltem Isopropanol bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 10000 g 30 min bei 4°C sedimentiert und in 180 ml TE-Puffer (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN
30 0-87969-309-6) resuspendiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA mit NaCl (1,2 M Endkonzentration) behandelt und erneut 30 min unter Verwendung des zweifachen Volumens an absolutem Ethanol bei -70°C gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 ml H₂O + RNase (50 mg/ml
35 Endkonzentration) aufgenommen. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C gelöst und die RNase-Spaltung wurde anschließend 1 Std. bei 37°C durchgeführt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

Beispiel 3: Isolierung von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-RNA aus
40 Pflanzen und *Phaeodactylum tricornutum*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wie Lein und Raps etc. erfolgt nach einer bei Logemann et al beschriebenen Methode (1987, Anal. Biochem. 163, 21) isoliert. Aus Moos kann
45 die Gesamt-RNA *Protonema*-Gewebe nach dem GTC-Verfahren (Reski et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 244:352-359) gewonnen werden.

RNA Isolierung aus *Phaeodactylum tricornutum*:

Tiefgefrorene Algenproben (-70°C) wurden in einem eiskaltem Mörser unter Flüssigstickstoff zu feinem Pulver zerreiben.

- 5 2 Volumen Homogenisationsmedium (12,024 g Sorbitol, 40,0 ml 1M Tris-HCl, pH 9 (0,2 M); 12,0 ml 5 M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10 % SDS wurden auf 200 ml mit H₂O aufgefüllt und der pH auf 8,5 eingestellt) und 4 Volumen Phenol mit 0,2 % Mercaptoethanol wurden bei 40 bis 50°C unter gutem
- 10 Mischen zu gefrorenem Zellpulver gegeben. Danach wurden 2 Volumen Chloroform hinzufügen und für 15 min kräftig gerührt. Es wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert und die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform (2 Vol) und abschließend mit Chloroform extrahiert.

15

Das erhaltene Volumen der wässrigen Phase wurde mit 1/20 Vol 4 M Na-Acetat (pH 6) und 1 Vol Isopropanol (eiskalt) versetzt und die Nukleinsäuren bei -20°C über Nacht (= ÜN) gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert und der

- 20 Überstand abgesogen. Es folgte ein Waschschriff mit 70 % EtOH und erneute Zentrifugation. Das Sediment wurde in Tris-Borat-Puffer (80 mM Tris-Borat-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,0) aufgenommen. Dann wurde der Überstand mit 1/3 Vol 8 M LiCl versetzt, gemischt 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren wurde
- 25 das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA erfolgte unter Verwendung von Dyna Beads[®] (Dynal, Oslo, Finnland) nach den Anweisungen im Protokoll

- 30 des Herstellers.

Nach der Bestimmung der RNA- oder poly(A)⁺-RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumina 3 M Natriumacetat, pH 4,6, und 2 Volumina Ethanol gefällt und bei -70°C aufbewahrt.

35

Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt

- 40 ((1986) Anal. Biochem. 152, 304)).

Beispiel 4: Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus *Phaeodactylum tricornutum*

- 45 wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese

durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XhoI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XhoI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

20

Beispiel 5: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zufälliger, vereinzelter Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massene excision und Retransformation von DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten E. coli-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

40 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'
5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepakets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung der in SEQ ID NO: 8

dargestellten Suchsequenz wurde mithilfe des BLAST-Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). Zwei Sequenzen aus *Phaeodactylum tricornutum* mit Homologien zur Suchsequenz aus *Physcomitrella patens* wurden eingehender charakterisiert.

Beispiel 5a: Isolation von Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum* über Polymerase Kettenreaktion mithilfe degenerierter Oligonukleotide:

Mithilfe von publizierten Desaturasen können Motive identifiziert werden, die für Δ -5 und Δ -6 Desaturasen typisch sind. Im folgenden sind Oligonukleotidsequenzen mit möglichen Variationen dargestellt. Unter der Oligonukleotidsequenz ist im Ein-Buchstaben-code die Aminosäure dargestellt, von der die Basenkombination abgeleitet werden kann. Z.B. bedeutet A/G, daß an dieser Position bei der Synthese des Bausteins statistisch gleichverteilt entweder ein A oder ein G in das Oligonukleotid eingebaut wird, da das von der korrespondierenden Aminosäure abgeleitete Basentriplett entweder ein AAA oder ein AAG sein kann. Die DNA Sequenz kann auch ein Inosin (i) enthalten, wenn die Bestimmung einer Base an dieser Position aufgrund des genetischen Codes drei oder vier unterschiedliche Basen erlaubt. Folgende Sequenzen und Primer können verwendet werden:

5'-Vorwärts-Primer:

	F1a:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	AAi	CA	T/C	AA				
	F1b:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	ACi	CA	T/C	AA				
30	F1a:	W	W	K		W	N/T	H		K/N				
	F1b:	W	W	K		W	K	H		K/N				
	F2a:	Gi	TGG	AA	A/G	GAi	A/C	Ai	CA	T/C	AA			
	F2b:	Gi	TGG	AA	A/G	TTG	A/C	Ai	CA	T/C	AA			
35	F2a:	G/W	W	K		E/D	K/Q/N	H		K/N				
	F2b:	G/W	W	K		W	K/Q/N	H		K/N				
	F3a:	T	A/T	i		TTG	AAi	A/C	A	A/G	C/A	G/A	i	CA
	F3b:	T	A/T	i		TTG	AAi	A/C	A	A/G	CAi			CA
	F3a:	W				W	K/N	H/N		R/Q				H
40	F3b:	Y				W	K/N	H/N		R/Q				H
	F4a:		GTi	TGG	A	A/T	G/A	GA	A/G		CA	A/G	CA	
	F4b:		GTi	TGG	A	A/T	G/A	A/T	A	T/C	CA	A/G	CA	
	F4a:		V		W		K/M		E		Q		H	
	F4b:		V		W		K/M		N/Y		Q		H	
45	F5a1:	CA	T/C	TA	T/C	TGG	AA	A/G	AA	T/C	CA	G	C	
	F5a1:	CA	T/C	TA	T/C	TGG	AA	A/G	AA	T/C	CA	A	C	
	F5a1:		H		Y		W	K		N	Q		H/Q	

80

F6a: TTG TTG AAi A/C A A/G AA i CA T/C AA
 F6a: W W K/N H/N K/N H K/N

3'- Reverse Primer

5 R1b: GG A/G AA iAG G/A TG G/A TG T/C TC
 R1b: GG A/G AA iAA G/A TG G/A TG T/C TC
 R1a: P F L H H E
 R1b: P F F H H E
 R2a1: AA iAG A/G TG A/G TG iA C/T iA/G T/C TG
 10 R2a2: AA T/C AA A/G TG A/G TG iA C/T iA/G T/C TG
 R2a1: F L H H V/I V/A Q
 R3a1: AT iTG iGG A/G AA iAA A/G TG A/G TG
 R3a2: AT A/G TT iGG A/G AA iAA A/G TG A/G TG
 R3a3: AT iTG iGG A/G AA iAG A/G TG A/G TG
 15 R3a4: AT A/G TT iGG A/G AA iAG A/G TG A/G TG
 R3a1: I/M H/Q P F F H H
 R3a2: I/M N P F L H H
 R4a1: CT iGG A/G AA iA A/G A/G TG A/G TG
 R4a2: GA iGG A/G AA iA A/G A/G TG A/G TG
 20 R4a3: GT iGG A/G AA iA A/G A/G TG A/G TG
 R4a1: = T/R/S P F F/L H H
 R5a1: AA iAA A/G TG A/G TG T/C TC T/A/G AT T/C TG
 R5a2: AA iAG A/G TG A/G TG T/C TC T/A/G AT T/C TG
 R5a1: F F H H E I Q
 25 R5a2: F L H H E I Q
 R6a1: T iGG iA A/G iAA A/G TG A/G TG iAC
 R6a1: T iGG iA A/G iAG A/G TG A/G TG iAC
 R6a1: T/N P L F/L H H V

- 30 Aufgrund verschiedener Variationsmöglichkeiten sind viele abgeleitete Oligonukleotide möglich, jedoch überraschenderweise gefunden wurde, dass dargestellte Oligonukleotide besonders zur Isolation von Desaturasen geeignet sein können.
- 35 Die Primer können in allen Kombinationen für Polymerase Kettenreaktionen eingesetzt werden. Mithilfe einzelner Kombinationen konnten Desaturase-Fragmente isoliert, wenn nachfolgende Bedingungen berücksichtigt wurden: Für PCR Reaktionen wurden jeweils 10 nMol Primer und 10 ng einer durch in vivo Excision
- 40 gewonnenen Plasmidbank eingesetzt. Die Plasmidbank konnte nach Protokollen des Herstellers (Stratagene) aus der Phagenbank isoliert werden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt
- 45 von 35 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C. Dabei wurde die Anlagerungstemperatur nach dem ersten Schritt von 55°C schrittweise um je 3°C erniedrigt und nach dem fünften Zyklus

eine Anlagerungstemperatur von 40°C beibehalten. Letztlich wurde ein Zyklus mit 10 min bei 72°C durchgeführt und der Ansatz durch Kühlen auf 4°C beendet.

5 Die Primerkombination F6a und R4a2 sind im Text unterstrichen gekennzeichnet und konnten erfolgreich zur Isolierung eines Desaturasefragmentes genutzt werden. Das resultierende Fragment konnte durch Sequenzierung verifiziert werden und zeigte Homologien zu einer Desaturase mit der Genbank Accession Nr. T36617
10 aus *Streptomyces coelicolor*. Die Homologie wurde mithilfe des BLASTP Programmes erhalten. Der Vergleich ist in Figur 4 dargestellt. Es ergaben sich Identitäten von 34 % und eine Homologie von 43 % zu Sequenz T36617. Das DNA-Fragment wurde gemäß Beispiel 7 in einem Hybridisierungsexperiment zur Isolierung
15 eines Volllängengens nach Standardbedingungen erfindungsgemäß eingesetzt.

Die Codierregion einer so isolierten DNA-Sequenz wurde durch Übersetzung des genetischen Codes in eine Polypeptidsequenz
20 erhalten. In SEQ ID NO: 3 ist eine 1434 Basenpaare lange Sequenz dargestellt, die durch beschriebenes Verfahren isoliert werden konnte. Die Sequenz besitzt ein Startcodon in Position 1 bis 3 und ein Stopcodon in Position 1432-1434 und konnte in ein 477 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden. Durch Ver-
25 gleich mit einer in WO 98 46763 beschriebenen Gensequenz wurde gefunden, dass ein nicht identisches aber homologes Fragment aus *Phaeodactylum tricornutum* codierend für 87 Aminosäuren vorbeschrieben wurde. Jedoch offenbart WO 98/46763 weder eine vollständige, funktionell aktive Desaturase noch Positions-
30 oder Substratspezifität. Dies wird auch dadurch deutlich, dass sowohl Homologien zur Δ -5, als auch zur Δ -6-Desaturase aus *Mortierella alpina* berichtet werden, ohne eine genaue Funktion festzulegen. Die erfindungsgemäße Sequenz hingegen codiert für eine funktionell aktive Δ -6-Acyl Lipid Desaturase.

35

Beispiel 6: Identifizierung von DNA Sequenzen codierend für Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

Die Vollständigensequenz der Δ -6-Acyl Lipid Desaturase Pp_des6
40 AJ222980 (NCBI Genbank Accession Nr.) aus dem Moos *Physcomitrella patens* (siehe auch Tabelle 1) sowie die Δ -12-acyl Lipid Desaturase Sequenz (Tabelle 1 siehe Ma_des12) aus *Mortierella alpina* AF110509 (AF110509 NCBI Genbank Accession Nr.) wurden für Sequenzvergleiche mithilfe des TBLASTN Suchalgorithmus
45 eingesetzt.

82

Die EST-Sequenzen PT0010070010R, PT001072031R sowie PT001078032R wurden zunächst aufgrund schwacher Homologien mit den Suchsequenzen aus *Physcomitrella* und *Mortierella* unter weiteren Kandidatengenen als Zielgen in Betracht gezogen. In Figur 1 und 5 in Figur 2 sowie Figur 2a ist das Ergebnis der zwei gefundenen est-Sequenzen dargestellt. Die gefundenen Sequenzen sind Teil der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus SEQ ID NO: 1 (Genname: Pt_des5, eigene Datenbank Nr. der Erfinder PT001078032R), SEQ ID NO: 5. (Genname: Pt_des12, eigene Datenbank NR. der 10 Erfinder PT0010070010R) und SEQ ID NO: 11 (Genname: Pt_des12.2, eigene Datenbank des Erfinders PT001072031R). Buchstaben zeigen identische Aminosäuren an, während das Pluszeichen eine chemisch ähnliche Aminosäure bedeutet. Die Identitäten bzw. Homologien aller erfindungsgemäß gefundener Sequenzen gehen aus Tabelle 2 15 zusammenfassend hervor.

Desaturasen können Cytochrom b5 Domänen aufweisen, die auch in anderen nicht Desaturasen codierenden Genen vorkommen. Cytochrom b5 Domänen zeigen mithin hohe Homologien an, obwohl es sich um 20 verschiedene Genfunktionen handelt. Desaturasen können schwach konservierter Bereiche lediglich als putative Kandidatengene identifiziert werden und müssen auf die Enzymaktivität und Positionsspezifität der enzymatischen Funktion hin geprüft werden. Beispielsweise zeigen auch verschiedene Hydroxylasen, 25 Acetylasen und Epoxygenasen ähnlich wie Desaturasen Histidin-Box Motive, so dass eine konkrete Funktion experimentell nachgewiesen werden muß und zusätzlich die Verifizierung der Doppelbindung erst eine sichere Enzymaktivität und Positionsspezifität einer Desaturase ermöglicht. Überraschenderweise wurde gefunden, 30 dass erfindungsgemäße Δ -6- und Δ -5- Desaturase besonders geeignete Substratspezifitäten aufweisen und besonders geeignet sind, um in Kombination mit einer Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella* zur Produktion von polyungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure genutzt werden können.

35 Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon PT001078032R ergab eine 1652 Basenpaare lange Sequenz. Die Sequenz codiert für ein Polypeptid von 469 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID NO: 2. Diese wurde erhalten durch Übersetzung des genetischen Codes aus SEQ ID NO: 1 mit einem Startcodon in Basenpaarposition 115-117 und mit einem Stopcodon in Basenpaarposition 1522-1524. Der Klon beinhaltet ein vollständiges Desaturase-Polypeptid, wie aus dem Sequenzvergleich in Figur 3 zu ersehen ist. Striche bedeuten identische Aminosäuren während Doppelpunkte und Einzelpunkte chemisch austauschbare, d.h. chemisch äquivalente Aminosäuren darstellen. 45 Der Vergleich wurde mit der BLOSUM62 Austauschmatrix für Amino-

83

säuren nach Henikoff & Henikoff durchgeführt: ((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Verwendete Parameter: Gap Weight: 8; Average Match: 2.912, Length Weight: 2, Average Mismatch: -2.003.

5

In Figur 6 und Figur 7 ist der Vergleich der MA_des12 Peptidsequenz mit den gefundenen Sequenzen dargestellt.

Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon

10 PT0010070010R ergab eine in SEQ ID NO: 5 dargestellte 1651 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 67-69 und einem Stopcodon in Position 1552-1554. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 6 dargestellt.

15 Die Sequenzierung des vollständigen identifizierten cDNA Fragmentes aus Klon PT0010072031R ergab eine in SEQ ID NO: 11 dargestellte 1526 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 92-94 und einem Stopcodon in Position 1400-1402. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 12
20 dargestellt.

In Tabelle 2 sind die Identitäten und Homologien erfindungsgemäßer Desaturasen untereinander und mit der Desaturase aus *Physcomitrella patens* und *Mortierella alpina* dargestellt. Die

25 Angaben wurden mithilfe des Programms Bestfit unter gegebenen Parametern wie unten definiert als Teilprogramm folgender Software erhalten: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA). Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein
30 blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.

Weiterhin ist in Figur 5 der Vergleich der Δ -6-acyl Lipid Desaturase aus *Physcomitrella patens* mit der Polypeptidsequenz des Klons Pt_des6 dargestellt.

35

Tabelle 2:

40	Homologie /	Suchsequenz	Suchsequenz
	Identität in %	Pp_des6	Ma_des12
	Pt_des5	34.92/26.37	n.d.
	Pt_des6	50.69/41.06	n.d.
	Pt_des12	n.d.	48.58/38.92
	Pt_des12.2	n.d.	48.37/41.60

45 n.d. = nicht durchgeführt

Mithilfe des Algorithmus TBLASTN 2.0.10: Altschul et al 1997, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 wurden über einen lokalen Datenbankvergleich Sequenzen mit höchster Sequenz-
 5 homologie bzw. Identität identifiziert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 2A dargestellt.

Tabelle 2A: Homologe mit den höchsten Sequenzhomologien bzw
 Identitäten zu erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen
 10 aus SEQ ID NO. 2, 4, 6 oder 12

Homologie / Identität (%)	Suchsequenz PT001070010R	Suchsequenz PT001072031R	Suchsequenz PT001078032R	Suchsequenz Pt_des6
15 L26296: Fad2 A. thaliana	50 % / 37 %	n.d.	n.d.	n.d.
U86072 Petro- selinum crispum Fad2 AL358652	n.d.	51/40	n.d.	n.d.
20 L. major putative desaturase AB020032 M. alpina delta	n.d.	n.d.	45/30	n.d.
25 6 desaturase	n.d.	n.d.	n.d.	53/38

Beispiel 7: Identifikation von Genen mittels Hybridisierung

30 Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

Homologe Gene (d.h. Voll-Längen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologen) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Ins-
 35 besondere zur Isolierung von funktionell aktiven Voll-Längengenen der in SEQ ID NO: 3 gezeigten kann die Methode genutzt werden. Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse werden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wurde
 40 die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgt bei hoch-stringenten Bedingungen. In wässriger Lösung werden die Hybridisierung und die Waschschrte bei einer Ionenstärke von 1 M NaCl und einer Temperatur von 68°C durchgeführt. Hybridisierungssonden wurden z.B. durch Markierung
 45 mittels radioaktiver (³²P-) Nicktranskription (High Prime, Roche, ..

Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale werden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Partiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht
5 identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wässrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

10

Die Isolierung von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, lässt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte
15 Oligonukleotide werden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide werden aneinander hybridisiert und ligiert, so dass Konkatemere entstehen. Die doppelsträngigen Konkatemere werden beispielsweise durch Nick-
20 transkription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgt gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

25

6 x SSC
0,01 M Natriumphosphat
1 mM EDTA (pH 8)
0,5 % SDS
30 100 mikrog/ml denaturierte Lachssperma-DNA
0,1 % fettarme Trockenmilch

Während der Hybridisierung wird die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-T_m oder bis auf Raum-
35 temperatur (bedeutet RT = ~ 23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschritten und Autoradiographie. Das Waschen wird mit extrem niedriger Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschriffe unter Verwendung von 4 X SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al.
40 (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, beschrieben.

Beispiel 8: Identifikation von Zielgenen durch Sichtung von
Expressionsbanken mit Antikörpern

Es wurden cDNA-Sequenzen zur Herstellung von rekombinantem
5 Protein zum Beispiel in *E. coli* verwendet (z.B. Qiagen QIAexpress
pQE-System). Die rekombinanten Proteine wurden dann gewöhnlich
über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Qiagen) affinitäts-
gereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden dann zur Herstellung
spezifischer Antikörper beispielsweise unter Verwendung von
10 Standardtechniken zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.
Anschließend wurden die Antikörper dann unter Verwendung einer
Ni-NTA-Säule, die mit rekombinantem Antigen vorgesättigt wird,
affinitätsgereinigt, wie von Gu et al., (1994) *BioTechniques*
17:257-262 beschrieben. Der Antikörper kann dann zur Durch-
15 musterung von Expressions-cDNA-Banken mittels immunologischem
Sichtung verwendet werden (Sambrook, J., et al. (1989),
"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current
Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

20

Beispiel 9: Transformation von *Agrobacterium*

Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann zum
Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell,
25 *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech)
oder C58C1 pGV2260 (Deblaere et al 1984, *Nucl. Acids Res.* 13,
4777-4788) *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms durchgeführt werden.
Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken
durchgeführt werden (ebenfalls Deblaere et al. 1984).

30

Beispiel 10: Pflanzentransformation

Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann unter
Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-
35 techniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort,
Robert A., *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Aufl., Dordrecht:
Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur:
BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E.,
Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton:
40 CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl-
transformation transformiert werden (Moloney et al., *Plant*
Cell 8 (1989) 238-242; De Block et al., *Plant Physiol.* 91 (1989)
45 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die *Agrobacterium*-
und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation
verwendeten binären Vektor und *Agrobacterium*-Stamm ab. Die

Rapss Selektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.

Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

Beispiel 11: Plasmide für die Pflanzentransformation

Geeignete binäre Vektoren und Transformationsmarker

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) oder pGPTV (Becker et al. 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) verwendet werden. Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA. Die binären Vektoren können unterschiedliche Markergene tragen. So kann etwa die Resistenz durch die Expression des nptII Markergens unter Kontrolle des 35S oder des nos Promoters erfolgen. Insbesondere kann das nptII-Markergen codierend für Kanamycin-Resistenz vermittelt durch Neomycinphosphotransferase gegen die herbizidresistente Form eines Acetolactat Synthasegens (AHAS oder ALS) ausgetauscht werden. Das ALS-Gen ist beschrieben in Ott et al., J. Mol. Biol. 1996, 263:359-360. Geeignet für manche Pflanzen ist auch die Verwendung des Hygromycin-Resistenz-Gens. Der v-ATPase-c1-Promotor kann in das Plasmid pBin19 oder pGPTV kloniert werden und durch Klonierung vor die kodierende Region des ALS Gens für die Markergenexpression genutzt werden. Der genannte v-ATPase-c1-Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus *Beta vulgaris* (Plant Mol Biol, 1999, 39:463-475). Der genannte nos Promoter Dabei können sowohl Sulphonylharnstoffe als auch Imidazolinone wie Imazethapyr oder Sulphonylharnstoffe als Antimetaboliten zur Selektion verwendet wer-

den. Alternativ kann auch der nos-Promoter für die Markergenexpression verwendet werden.

Beispiel 12: Ermittlung von geeigneten Promotoren für die
5 Expression in Lein

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der DC3-
10 oder der LeB4- oder der USP-Promotor oder der Phaseolin-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement wie z.B. der Napin- oder Arcelin Promotor (Goossens et al. 1999, Plant Phys. 120(4):1095-1103 und Gerhardt et al. 2000, Biochimica et Biophysica Acta 1490(1-2):87-98) kann
15 verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor oder ein v-ATPase-cl Promotor verwenden.

Um die Eigenschaften des Promotors zu bestimmen und die essentiellen Elemente desselben, die seine Gewebespezifität ausmachen,
20 zu identifizieren, ist es erforderlich, den Promotor selbst oder verschiedene Fragmente desselben vor ein sogenanntes Reportergen zu setzen, das eine Bestimmung der Expressionsaktivität ermöglicht. Beispielfür ein Reportergen sei die bakterielle
25 β -Glucuronidase (GUS) genannt (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907). Die β -Glucuronidase Aktivität kann *in-situ* mittels eines chromogenen Substrates wie 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure im Rahmen einer Aktivitätsfärbung bestimmt werden (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter 5,
30 387-405). Für die Untersuchungen der Gewebespezifität wird das pflanzliche Gewebe geschnitten, eingebettet, gefärbt und analysiert wie beschrieben (z.B. Bäumlein H et al., 1991 Mol Gen Genet 225: 121-128).

35 Fluorimetrischer GUS-Test (nach Montgomery et al., 1993)

Dieser Assay erlaubt eine quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität in dem untersuchten Gewebe. Für die quantitative Aktivitätsbestimmung wird als Substrat für die β -Glucuronidase MUG (4-Methyl-umbelliferyl-beta-D-glucuronid) verwendet, das in MU (Methyl-umbelliferon) und Glucuronsäure gespalten wird.
40

Dabei wird zunächst ein Proteinextrakt des gewünschten Gewebe hergestellt, dem dann das Substrat der GUS zugesetzt wird. Das
45 Substrat ist erst nach der Umsetzung durch GUS fluorimetrisch messbar. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden Proben entnommen, die anschließend im Fluorimeter gemessen werden. Dieser Test

wurde mit Leinembryonen verschiedener Altersstadien durchgeführt (21, 24 oder 30 Tage nach Beginn der Blüte, daf = days after flowering). Dazu wurde je ein Embryo in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Schwingmühle (Retsch MM 2000) in flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben. Nach Zugabe von 100 ml EGL-Puffer wurde für 10 min bei 25°C und 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ein zweites Mal zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Von diesem Proteinextrakt wurden 25 ml mit 65 ml EGL-Puffer (ohne DTT) versetzt und für den GUS-Assay eingesetzt. Nun wurden 10 ml des Substrates MUG (10 mM 4-Methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronid) dazugegeben, vortex und sofort 30 ml als Nullwert entnommen und mit 470 ml Stopp-Puffer (0,2 M Na₂CO₃) versetzt. Dieser Vorgang wurde für alle Proben in einem Abstand von 30 s wiederholt. Die entnommenen Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Weitere Messwerte wurden nach 1 h und nach 2 h entnommen. Für die Messung im Fluorimeter wurde eine Eichreihe erstellt, die Konzentrationen von 0,1 mM bis 10 mM MU (4-Methyl-umbelliferon) enthielt. Waren die Probenwerte außerhalb dieser Konzentrationen, wurde weniger Proteinextrakt eingesetzt (10 ml, 1 ml, 1 ml aus 1:10 Verdünnung), und es wurden kürzere Zeitabstände gemessen (0 h, 30 min, 1 h). Die Messung erfolgte bei einer Excitation von 365 nm und einer Emission von 445 nm in einem Fluoroscanner II-Gerät (LabSystem).

Alternativ kann die Substratspaltung unter alkalischen Bedingungen fluorometrisch verfolgt werden (Anregung bei 365 nm, Messung der Emission bei 455 nm; Spectrofluorimeter BMG Polarstar+) wie beschrieben in Bustos M.M. et al., 1989 Plant Cell 1:839-853. Alle Proben wurden einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) unterzogen, um so eine Aussage über die Promotoraktivität und -stärke in verschiedenen Geweben und Pflanzen erlauben.

EGL-Puffer

35 0,1 M	KPO ₄ , pH 7,8
1 mM	EDTA
5 %	Glycerin
1 M	DTT

Als weitere Beispiele für Reportergene, die äquivalent benutzt werden können, seien beispielhaft das grün fluoreszierende Protein (GFP) und dessen Derivate genannt (C.Reichel et al. (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, 5888-5893 und J.Sheen et al., (1995) Plant Journal 8, 777-784) und verschiedene Luciferasen (A.Millar et al. (1992) Plant Mol. Biol. Reporter 10, 324-414). Die ent-

sprechenden Detektionsmethoden sind dem Fachmann bekannt und z.B. genannter Literatur beschrieben.

Beispiele für Promoter-Reportergen-Konstrukte für oben genannte
5 Promotoren sind im folgenden gegeben. Von diesen Promotoren können Fragmente mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert werden.

10 Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

LeB4 vorne: GAAAGCTTCTCGAGTTATGCATTTCTT

LeB4 hinten: GGGTCTAGATCTGTGACTGTGATAG

DC3a vorne: AGTGGATCCCCGAGCTAACCACAACT

15 DC3a hinten: ATAAGCTTTTTCTTTGCAGA

napinvorne: GAAAGCTTCTAATATGATAAACTCTG

napinhinten: GGGTCTAGAAACACATACAAACATCAC

Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind
20 allgemein literaturbekannt.

In einem ersten Schritt werden die Promotorfragmente über PCR amplifiziert, mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in die obigen Kassetten einkloniert. Beispielsweise wird das
25 LeB4(700)-PCR-Fragment mit XbaI und HindIII geschnitten und in den Vektor pGPTV in die HindIII und XbaI-Schnittstellen 5' vor dem GUS Reportergen kloniert. Das PCR-amplifizierte DC3-Promoterfragment kann mit BamHI und HindIII geschnitten, z.B. in pBluescript (Stratagene) subkloniert und dann in pGPTV in geeignete
30 Schnittstellen vor das GUS-Reportergen kloniert werden.

Beispielsweise kann ein mit obigen Primern PCR-amplifiziertes napin-Promotorfragment mit einer Größe von 1055bp nach Verdau mit HindIII und XbaI in pGPTV vor das GUS Reportergen einkloniert
35 werden. Ein äquivalentes Konstrukt könnte ein Napin-Promoterfragment von 1100bp 5'-kloniert vor ein GUS Reportergen mit Intron mit in 3' Richtung nachfolgendem Nos-Terminator in einem pHL9000-Vektor (Hausmann & Töpfer, 1999) sein.

40 Unter Verwendung von oben beschriebenen oder äquivalenten Konstrukten nach Transformation in Lein der Sorte Flanders, läßt sich die GUS-Aktivität in transgenen Leinembryonen verschiedener Altersstadien messen, die mit einem der folgenden Konstrukte transformiert wurden: Napin-GUS, 35S-GUS, LeB4-GUS, USP-GUS. Die
45 Werte sind Mittelwerte aus ein bis fünf Messungen mit verschiede-

91

nen Proteinmengen. Pro Konstrukt wurden je drei Embryonen quantitativ analysiert.

In der quantitativen Analyse ergaben sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen samenspezifischen Promotoren. Der Napin Promotor aus *Brassica napus* erwies sich als um zwei bis drei Zehnerpotenzen weniger aktiv als die beiden Promotoren aus *Vicia faba* (LeB4 und USP). Die GUS-Aktivität nahm in der Reihenfolge Napin, LeB4 und USP zu. Die Positivkontrolle 35S bewegte sich in ihrer Aktivität zwischen LeB4 und USP, wohingegen die Negativkontrolle, der nicht transformierte Wildtyp (Sorte Flanders), so gut wie keine Aktivität besaß. Die folgende Tabelle gibt die Mittelwerte der Aktivitäten in den einzelnen Altersstadien sowie gesamt für jedes Konstrukt wieder.

15

Tabelle 3.4: Übersicht über die mittleren GUS-Aktivitäten von Leinembryonen, transformiert mit verschiedenen GUS-Konstrukten. daf: Tage nach Beginn der Blüte.

20 Mit * markiert wurden Werte, die nur einer Messung zugrundeliegen.

GUS-Konstrukt	GUS-Aktivität [nmol/h/mg Protein]	GUS-Aktivität [nmol/h/mg Protein]	GUS-Aktivität [nmol/h/mg Protein]	GUS-Aktivität [nmol/h/mg Protein]	% vs. 35S
	Mittelwert 21 daf	Mittelwert 24 daf	Mittelwert 30 daf	Gesamtmittelwert	
Ohne	0,06	0,06	*0,02	0,05	0,0007
35S	649,00	913,00	639,00	734,00	100,00
Napin	7,70	5,70	3,70	5,70	0,80
LeB4	1778,00	253,00	283,00	771,00	105,00
USP	2843,00	3770,00	2107,00	2907,00	396,00

35

Beispiel 13: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) oder pGPTV (Becker et al 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) oder Derivate davon verwendet werden. Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA. Die binären Vektoren können unterschiedliche Markergene tragen. Insbesondere kann das nptII-Markergen codierend für Kanamycin-Resistenz vermittelt

durch Neomycinphosphotransferase gegen die herbizidresistente Form eines Acetolactat Synthasegens (Abkürzung: AHAS oder ALS) ausgetauscht werden. Das ALS-Gen ist beschrieben in Ott et al., J. Mol. Biol. 1996, 263:359-360. Der v-ATPase-c1-Promotor kann in
5 das Plasmid pBin19 oder pGPTV kloniert werden und durch Klonierung vor das ALS Codierregion für die Markergenexpression genutzt werden. Der genannte Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus beta-Vulgaris (Plant Mol Biol, 1999, 39:463-475). Dabei können sowohl Sulphonylharnstoffe als auch Imidazolinone
10 wie Imazethapyr oder Sulphonylharnstoffe als Antimetaboliten zur Selektion verwendet werden.

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann
15 die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der DC3- oder der LeB4- oder der USP-Promotor oder der Phaseolin-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement wie z.B. der Napin- oder Arcelin Promotor Goossens et al. 1999, Plant Phys. 120(4):1095-1103 und Gerhardt
20 et al. 2000, Biochimica et Biophysica Acta 1490(1-2):87-98) kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor oder ein v-ATPase C1 Promotor verwenden.

25 Insbesondere lassen sich Gene codierend für Desaturasen und Elongasen durch Konstruktion mehrerer Expressionskassetten hintereinander in einen binären Vektor klonieren, um den Stoffwechselweg in Pflanzen nachzubilden.

30 Innerhalb einer Expressionskassette kann das zu exprimierende Protein unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im
35 Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

Beispiele für Multiexpressionskassetten sind im folgenden gegeben.

40

I.) Promotor-Terminator-Kassetten

Expressionskassetten bestehen aus wenigstens zwei funktionellen Einheiten wie einem Promotor und einem Terminator. Zwischen
45 Promotor und Terminator können weitere gewünschte Gensequenzen wie Targetting-Sequenzen, Codierregionen von Genen oder Teilen davon etc. eingefügt werden. Zum Aufbau von Expressionskassetten

93

werden Promotoren und Terminatoren (USP Promotor: Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67); OCS Terminator: Gielen et al. EMBO J. 3 (1984) 835ff.) mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert.

Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

USP1 vorne: CCGGAATTCTGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 USP2 vorne: CCGGAATTCTGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 10 USP3 vorne: CCGGAATTCTGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 USP1 hinten: AAAACTGCAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCTGGCTATGAAGAAATT
 USP2 hinten: CGCGGATCCGCTGGCTATGAAGAAATT
 USP3 hinten: TCCCCCGGGATCGATGCCGCGCAGATCTGCTGGCTATGAAGAAATT
 OCS1 vorne: AAAACTGCAGTCTAGAAGGCCCTCTGCTTTTAATGAGATAT
 15 OCS2 vorne: CGCGGATCCGATATCGGGCCCGCTAGCGTTAACCCTGCTTTAATGAGATAT
 OCS3 vorne: TCCCCCGGGCCATGGCCTGCTTTAATGAGATAT
 OCS1 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA
 OCS2 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA
 OCS3 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

20

Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind allgemein literaturbekannt.

In einem ersten Schritt werden ein Promotor und ein Terminator über PCR amplifiziert. Dann wird der Terminator in ein Empfängerplasmid kloniert und in einem zweiten Schritt der Promotor vor den Terminator inseriert. Mithin erhält man eine Expressionskassette auf einem Trägerplasmid. Auf Basis des Plasmides pUC19 werden die Plasmide pUT1, pUT2 und pUT3 erstellt.

30

Die Konstrukte sind erfindungsgemäß in SEQ ID NO: 13, 14 und 15 definiert. Sie enthalten auf Basis von pUC19 den USP-Promotor und den OCS Terminator. Auf Basis dieser Plasmide wird das Konstrukt pUT12 erstellt, indem pUT1 mittels SalI/ScaI geschnitten wird und 35 pUT2 mittels XhoI/ScaI geschnitten wird. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung ampicillin-resistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die zwei Expressionskassetten enthalten. Die XhoI/SalI Ligation kompatibler Enden hat dabei die beiden Schnittstellen XhoI und SalI zwischen den Expressionskassetten eliminiert. Es resultiert das Plasmid pUT12, das in SEQ ID NO: 16 definiert ist. Anschließend wird pUT12 wiederum mittels Sal/ScaI geschnitten und pUT3 mittels XhoI/ScaI ge- 45 schnitten. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung ampicillinresistenter Kolonien DNA präpariert

94

und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die drei Expressionskassetten enthalten. Auf diese Weise wird ein Set von Multiexpressionskassetten geschaffen, dass für die Insertion gewünschter DNA genutzt werden kann und in Tabelle 3 beschrieben wird und zudem noch weitere Expressionskassetten aufnehmen kann.

Diese enthalten folgende Elemente:

Tabelle 3

10

	pUC19-Derivat	Schnittstellen vor dem USP Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
	pUT1	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
15	pUT2	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
	pUT3	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/ AscI/HindIII
	pUT12 Doppel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI Und BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
20	pUT123 Tripel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	1.BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und 2.BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI und 3.BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

25

Weiterhin lassen sich wie beschrieben und wie in Tabelle 4 näher spezifiziert weitere Multiexpressionskassetten mithilfe des

- 30 i) USP-Promotors oder mithilfe des
 ii) ca. 700 Basenpaare 3'-Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
 iii) DC3-Promotors erzeugen und für samenspezifische Genexpression einsetzen.

35

Der DC3-Promotor ist beschrieben bei Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368 und besteht lediglich aus der Region -117 bis +27 weshalb er mithin einer der kleinsten bekannten samenspezifischen Promotoren darstellt.

40

Von diesen Promotoren können Fragmente mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert werden.

45

Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

95

LeB4 vorne: GAAAGCTTCTCGAGTTATGCATTTCTT
LeB4 hinten: GGGTCTAGATCTGTGACTGTGATAG
DC3a vorne: CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAG
DC3a hinten: CGCGGATCCTAGCTTTTCTTGGCAGATG

5

Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind allgemein literaturbekannt.

In einem ersten Schritt werden die Promotorfragmente über PCR amplifiziert, mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in die obigen Kassetten einkloniert. Beispielsweise wird das LeB4(700)-PCR-Fragment mit XhoI und BglII geschnitten und in die XhoI und BglII-Schnittstellen des Plasmids pUT3 eingesetzt, um pLT3 zu erhalten.

15

Vorteilhafte Expressionskassetten enthalten auf Basis von pUC19 (Vieira und Messing (1982); Gene 19, 259), die SEQ ID NO: 32, den LeB4-Promotor und die Sequenzen SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 oder SEQ ID NO: 35. Auf Basis dieser Plasmide wird das Konstrukt pLT12 erstellt, indem pUT1 mittels SalI/ScaI geschnitten wird und pUT2 mittels XhoI/ScaI geschnitten wird. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung Ampicillin-resistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die zwei Expressionskassetten enthalten. Die XhoI/SalI Ligation kompatibler Enden hat dabei die beiden Schnittstellen XhoI und SalI zwischen den Expressionskassetten eliminiert. Es resultiert das Plasmid pUT12, das in SEQ ID NO: 16 definiert ist. Anschließend wird pUT12 wiederum mittels Sal/ScaI geschnitten und pUT3 mittels XhoI/ScaI geschnitten. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung Ampicillin-resistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die drei Expressionskassetten enthalten. Auf diese Weise wird eine Auswahl von Multiexpressionskassetten geschaffen, die für die Insertion gewünschter DNA genutzt werden kann und in Tabelle 3 beschrieben wird und zudem noch weitere Expressionskassetten aufnehmen kann.

Die Expressionskassetten können mehrfach den selben Promotor enthalten oder aber über drei verschiedene Promotoren aufgebaut werden.

45

Tabelle 4: Multiple Expressionskassetten

	Plasmidname des pUC19-Derivates	Schnittstellen vor dem jeweiligen Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
5	pUTI (pUC19 mit USP-OCS1)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/ XbaI/StuI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
	pDCT (pUC19 mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
10	pLeBT (pUC19-mit LeB4(700)-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII
15	pUD12 (pUC 19 mit mit USP-OCS1 und mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
20	pUDL123 Triple expression cassette (pUC19 mit USP/ DC3 und LeB4-700)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/ (EcoRV*)/ApaI/ NheI/HpaI und (3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

* EcoRV Schnittstelle schneidet im 700 Basenpaarfragment des LeB4 Promotors (LeB4-700)

25

Analog lassen sich weitere Promotoren für Multigenkonstrukte erzeugen insbesondere unter Verwendung des

30

a) 2,4 kB Fragmentes des LeB4-Promotors (Bäumlein et al., 1991: Mol.Gen.Genet. 225,121-128) oder mithilfe des

b) Phaseolin-Promotors (Bustos et al. (1989) Plant Cell 1,839-853) oder mithilfe des

35

c) konstitutiven v-ATPase c1-Promotors.

40

Es kann insbesondere wünschenswert sein, weitere besonders geeignete Promotoren zum Aufbau samenspezifischer Multiexpressionskassetten wie z.B. eines der Fragmente des Napin-Promotors (Stalberg et al., 1993: Plant Mol.Biol.23,671-683) oder den Arcelin-5 Promotor (A.Goossens et al., 1999: plant Physiol. 120,1095-1104) zu verwenden.

45

97

- ii) Erstellung von Expressionskonstrukten in pUC19- oder pGPTV Derivaten, die Promotor und Terminator erhalten und in Kombination mit gewünschten Gensequenzen zur PUFA Gen-expression in pflanzlichen Expressionskassetten enthalten.

5

- Multiexpressionskassetten können mittels AscI direkt von pUC19-Derivaten aus Tabelle 3 in den Vektor pGPTV+AscI (siehe iii.)) über die AscI Schnittstelle inseriert werden und stehen zur Inserierung von Zielgenen zur Verfügung. Die entsprechenden
- 10 Genkonstrukte (pBUT1 ist in SEQUENZ ID NO: 20, pBUT2 ist in SEQUENZ ID NO: 21, pBUT 3 ist in SEQUENZ ID NO: 22, pBUT12 ist in SEQUENZ ID NO: 22 und pBUT123 ist in SEQUENZ ID NO: 24 dargestellt) stehen erfindungsgemäß als Kit zur Verfügung. Alternativ können Gensequenzen in die pUC19 basierten
- 15 Expressionskassetten inseriert werden und als AscI Fragment in pGPTV+AscI eingesetzt werden.

- In pUT12 wird zunächst über BstXI und XbaI die D-6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die
- 20 D-6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert. Es entsteht das Konstrukt pUT-ED. Das AscI Fragment aus dem Plasmid pUT-ED wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung
- 25 ermittelt. Es entsteht das Plasmid pB-DHGLA, dessen vollständige Sequenz in SEQUENZ ID NO. 25 dargestellt ist. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO. 26 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella in SEQUENZ ID NO: 27.

30

- In pUT123 wird zunächst über BstXI und XbaI die Δ-6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die Δ-6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert und schließlich die Δ-5-Desaturase
- 35 aus Phaeodactylum (Pt_des5) über BglII in die dritte Kassette inseriert. Das Dreifachkonstrukt erhält den Namen pARA1. Unter Berücksichtigung sequenzspezifischer Restriktionsschnittstellen können weitere Expressionskassetten gemäß Tabelle 5 mit der Bezeichnung pARA2, pARA3 und pARA4 erstellt werden.

40

- Das AscI Fragment aus dem Plasmid pARA1 wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung ermittelt. Die vollständige Sequenz des resultierenden Plasmides
- 45 pBARA1 ist in SEQUENZ ID NO. 28 dargestellt. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO. 29 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella

98

in SEQUENZ ID NO: 30 und die der delta-5 Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* in SEQUENZ ID NO: 31.

Tabelle 5: Kombinationen von Desaturasen und Elongasen

5

	Gen Plasmid	Δ -6-Desaturase	Δ -5-Desaturase	Δ -6-Elongase
1	PUT-ED	Pp_des6	---	Pp_PSE1
2	pARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
3	pARA2	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
10 4	pARA3	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
5	pARA4	Ce_des6	Ce_des5	Ce_PSE1
6	PBDHGLA	Pt_des6	---	Pp_PSE1
7	PBARAI	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1

- 15 Plasmide 1 bis 5 sind pUC Derivate, Plasmide 6 bis 7 sind binäre Pflanzentransformationsvektoren

Pp = *Physcomitrella patens*, Pt = *Phaeodactylum tricornutum*
 Pp_PSE1 entspricht der Sequenz aus SEQ ID NO: 9.

- 20 PSE = PUFA spezifische Δ -6-Elongase
 Ce_des5 = Δ -5-Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Genbank Acc. Nr. AF078796)
 Ce_des6 = Δ -6-Desaturase aus *Caenorhabditis elegans elegans* (Genbank Acc. Nr. AF031477, Basen 11-1342)
 25 Ce_PSE1 = Δ -6-Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Genbank Acc. Nr. AF244356, Basen 1-867)

- Auch weitere Desaturasen oder Elongasegensequenzen können in Expressionskassetten beschriebener Art inseriert werden wie
 30 z.B. Genbank Acc. Nr. AF231981, NM_013402, AF206662, AF268031, AF226273, AF110510 oder AF110509.

- iii) Transfer von Expressionskassetten in Vektoren zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und zur
 35 Transformation von Pflanzen

- Chimäre Genkonstrukte auf Basis der in pUC19 beschriebenen können mittels AscI in den binären Vektor pGPTV inseriert. Die multiple Klonierungssequenz wird zu diesem Zweck um eine AscI Schnittstelle erweitert. Zu diesem Zweck wird der Polylinker als zwei
 40 doppelsträngige Oligonukleotide neu synthetisiert, wobei eine zusätzliche AscI DNA Sequenz eingefügt wird. Das Oligonukleotid wird mittels EcoRI und HindIII in den Vektor pGPTV inseriert. Es entsteht das Plasmid pGPTV+AscI. Die notwendigen Kloniertechniken
 45 sind dem Fachmann bekannt und können einfach wie in Beispiel 1 beschrieben nachgelesen werden.

Beispiel 14: *In vivo*-Mutagenese

Die *in vivo*-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z.B. *mutHLS*, *mutD*, *mutT* usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W.D. (1996) *DNA repair mechanisms*, in: *Escherichia coli and Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) *Strategies* 7:32-34, erläutert. Der Transfer mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

20 Beispiel 15: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus kann auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen werden.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) *Mol. Microbiol.* 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

Northern-Hybridisierung

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit
5 einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und
10 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Herings-sperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von
15 alpha-³²P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschriffe wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durch-
20 geführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie
25 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer
30 Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des
35 gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 16: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

40 Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen)
45 gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse-

- techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
- 5 (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III:
- 10 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988)
- 15 Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).
- 20 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben
- 25 bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford:
- 30 Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

- Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu ana-
- 35 lysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere
- 40 Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F.
- 45 Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192

(ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, 5 Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäure-
10 produkten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromato-
15 graphie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das
20 Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl-
25 und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min
30 und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

35 Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben)
40 gezeigt werden.

Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

- 5 Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der neuen Desaturase pPDesaturasel aus *Physcomitrella patens* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwendeten wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wurde in Luria-Bertini-Brühe (LB,
- 10 Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C kultiviert. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMDm; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston,
- 15 R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose kultiviert. Für feste Medien wurden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco)
- 20 hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

Beispiel 17: Klonierung und Expression PUFA-spezifischer
Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

- 25 Für die Expression in Hefe wurden die *Phaeodactylum tricornutum* -cDNA-Klone aus Seq ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bzw. die Sequenzen aus SEQ ID NO: 7 oder 9 bzw andere gewünschte Sequenzen zuerst so modifiziert, dass lediglich die Codierregion mittels Polymerase
- 30 Kettenreaktion unter Zuhilfenahme zweier Oligonukleotide amplifiziert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Konsensussequenz vor dem Startcodon zur effizienten Translation eingehalten wurde. Entweder wurde hierzu die Basenfolge ATA oder AAA gewählt und vor das ATG in die Sequenz eingefügt (Kozak, M.
- 35 (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292). Vor diesem Konsensustriplett wurde zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, die kompatibel sein muss zur Schnittstelle des Zielvektors,
- 40 in den das Fragment kloniert werden soll und mit dessen Hilfe die Genexpression in Mikroorganismen oder Pflanzen erfolgen soll.

104

Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-(Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Die Anlagerungstemperatur wurde je nach gewählten Oligonukleotiden variiert. Pro Kilobasenpaare DNA ist von einer Syntheszeit von etwa einer Minute auszugehen. Weitere Parameter, die Einfluss auf die PCR haben wie z.B. Mg-Ionen, Salz, DNA Polymerase etc., sind dem Fachmann auf dem Gebiet geläufig und können nach Bedarf variiert werden.

Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligations Kit (Pharmacia) ligiert, wobei die pUC-Derivate erhalten wurden. Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) an ampicillinresistenten Transformanden durchgeführt, und positive Klone mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

Δ5 Acyl Lipid desaturase, Pt_des5

30 Primer 1 GAG CTC ACA TAA TGG CTC CGG ATG CGG ATA AGC
Primer 2 CTC GAG TTA CGC CCG TCC GGT CAA GGG

Das PCR-Fragment (1428bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment SacI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

Δ6 Acyl Lipid desaturase, Pt_des6

Primer 3 GGA TCC ACA TAA TGG GCA AAG GAG GGG ACG CTC GGG
40 Primer 4 CTC GAG TTA CAT GGC GGG TCC ATC GGG

Das PCR-Fragment (1451 bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

105

$\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12

Primer 5 GGA TCC ACA TAA TGG TTC GCT TTT CAA CAG CC

Primer 6 CTC GAG TTA TTC GCT CGA TAA TTT GC

5 $\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12.2

Primer 7 GGA TCC ACA TAA TGG GTA AGG GAG GTC AAC G

Primer 8 CTC GAG TCA TGC GGC TTT GTT TCG C

Das PCR Fragment (1505bp) wurde mithilfe des Sure Clone
10 Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment
BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender
Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

Die Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzym/en passend zur
15 eingeführten Schnittstelle der Primersequenz gespalten und
das erhaltene Fragment in die kompatiblen Restriktionsstellen
des dephosphorylierten Hefe-E. coli-Shuttlevektors pYES2 oder
pYES6 ligiert, wobei pYES-Derivate erhalten werden. Nach der
Transformation von E. coli und DNA-Minipräparation aus den
20 Transformanden wurde die Orientierung des DNA-Fragments im
Vektor durch geeignete Restriktionsspaltung oder Sequenzierung
überprüft. Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem
Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel,
Düringen) angezogen.

25 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 wurde mit den pYES-Derivaten
und pYES Leervektor mittels eines PEG/Lithiumacetat-Protokolls
transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion
auf CMdum-Agarplatten mit 2 % Glucose wurden pYES-Derivate-
30 Transformanden und eine pYES2-Transformande zur weiteren Anzucht
und funktionellen Expression ausgewählt. Bei pYES6-Derivaten
wurde Blastocidin als Antimetabolit verwendet. Im Fall von
Coexpressionen auf Basis von pYES2 und pYES6 wurde auf Minimal-
medium mit Blastocidin selektiert.

35 Funktionelle Expression einer Desaturaseaktivität in Hefe

Vorkultur

40 20 ml CMdum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2 % (Gew./Vol.)
Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pYES2) angeimpft
und 3 Tage bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte
bei 600 nm (OD₆₀₀) von 1,5 bis 2 erreicht wurde. Wurde als Vektor
pYES6 verwendet, so wurde zusätzlich auf Blastocidin als Anti-
45 metabolit selektioniert.

106

Hauptkultur

Für die Expression wurden 20 ml CMdum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2 % Raffinose und 1 % (Vol./Vol.) Tergitol NP-40
5 mit Fettsäuresubstraten auf eine Endkonzentration von 0,003 % (Gew./Vol.) angereichert. Die Medien wurden mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 2 % (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,8-1,2 geerntet wurden.

10

Fettsäureanalyse

Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen von 5
15 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES oder Singular FAME) wurden die Zellsedimente mit 1 M methanolischer H₂SO₄ und 2 % (Vol./Vol.)
20 Dimethoxypropan für 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50 mikrol Petrol-
25 ether gelöst. Die Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25 mikro m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C
30 (5 min halten) mit einer Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

35

Expressionsanalyse

Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen Fettsäuresubstrate wurden ermittelt und so Quantität und Qualität der
40 Desaturasereaktion gemäß Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 erfasst.

Ergebnis der Expression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ-6-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

45

107

Tabelle 6

Fettsäure		pYes2	pYes2-Ptd6 gefüttert mit		
		-	-	+18:2	+18:3
5	16:0	13,3	18,9	28,4	16,7
	16:1Δ9	45,4	44,7	12,5	16,9
	16:2Δ6,9	-	4,3	-	-
	18:0	4,9	6,3	10,4	9,1
	18:1Δ9	36,4	24,1	6,8	11,8
10	18:2Δ6,9	-	1,8	-	-
	18:2Δ9,12	-	-	33,4	-
	18:3Δ6,12,15	-	-	4,9	-
	18:3Δ9,12,15	-	-	-	43,1
	18:4Δ6,9,12,15	-	-	-	2,3

15 Die Angaben stellen Mol-% entsprechender cis-Fettsäuren dar.

Ergebnis der Expression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ-5-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

20 Tabelle 7

Fett- säure		pYES2	pYES_Ptd5-Konstrukt gefüttert mit							
		Kon-.								
		Leer	trolle	18:2	18:3	20:1	-20:1	20:2	20:3	20:3
25	16:0Δ	16,9	20,4	27,7	24,4	16,2	21	17,6	19,5	22,8
	16:1Δ9	44,7	44,1	13,2	9,6	37,4	39,4	38,3	36,9	30,7
	18:0	6,1	6,9	10,54	9,8	4,7	7,9	6,3	6,8	8,2
	18:1Δ9	31,72	28,1	8,77	6	15	26	29,5	25,6	21,1
	18:2Δ5,9	0,17	0	0	0	0,09	0,21	0,09	9	
30	18:2Δ9,12	-	39,7	-	-	-	-	-	-	-
	18:3Δ9,12,15	-	-	49,9	--	-	-	-	-	-
	20:1Δ8	-	-	-	25,5	-	-	-	-	-
	20:1Δ11	-	-	-	-	5,41	-	-	-	-
	20:2Δ5,11	-	-	-	-	0,21	-	-	-	-
35	20:2Δ11,14	-	-	-	-	-	6,48	-	-	-
	20:3Δ5,11,14	-	-	-	-	-	0,76	-	-	-
	20:3Δ11,14,17	-	-	-	-	-	-	9,83	-	-
	20:3Δ8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	13,69
	20:4Δ5,11,14,17	-	-	-	-	-	-	1,16	-	-
40	20:4Δ5,8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	3,08

Die Angaben stellen Mol-% Fettsäuren von cis-Fettsäuren dar.

Aus den Substratumsetzungen geht hervor, dass die verwendete Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum* und die Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens* bzgl. der Substrataktivität und insbesondere der Substratspezifität geeignet sind, um Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure mithilfe erfindungsgemäßer Sequenzen zu produzieren.

Die Fragmentierungsmuster und Massenspektren von DMOX-Derivaten von Standards als auch den Peakfraktionen per GC identifizierter Fettsäuren der in Tabelle 6, 7 und 8 aufgeführten, zeigen vergleichsweise identische Ergebnisse, wodurch die jeweilige Position der Doppelbindung über die bloße GC-Detektion hinaus abgesichert wurde.

15 Beispiel 18: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraction wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

35 Die Überstandsfraction aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

108

Aus weiteren Fütterungsversuchen wurde gefunden, dass C18:1 Δ 9 in der Anwesenheit von C18:2 Δ 9,11 oder C18:3 Δ 9,12,15 oder C20:1 Δ 8 Fettsäuren nicht desaturiert wurde während in Anwesenheit von C20:1 Δ 11, C20:2 Δ 11,14 und C20:3 Δ 8,11,14 auch C18:1 desaturiert wird. Ebenfalls keine Desaturierung erfolgte in Anwesenheit von C20:3 Δ 8,11,14.

Bei Nutzung des Protease-defizienten Hefestammes C13BYS86 (Kunze I. et al., Biochemica et Biophysica Acta (1999) 1410:287-298) für die Expression der Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* auf Vollmedium mit Blastocidin wurde gefunden, dass C20:4 Δ 8,11,14,17 als Substrat der Δ -5-Desaturase mit 20 % Umsatzrate ebenso gut umgesetzt wurde wie C20:3 Δ 8,11,14. Alternativ können auch die Auxotrophiemarker leu2, ura3 oder his für Genexpression genutzt werden.

In einem weiteren Coexpressionsexperiment von Δ -5 Desaturase aus *Phaeodactylum* und Δ -6 Elongase aus *Physcomitrella* wurde der Stamm UTL7A (Warnecke et al., J. Biol. Chem. (1999) 274(19):13048-13059) benutzt, wobei die Δ -5 Desaturase ca 10 % C20:3 Δ 8,11,14 zu C20:4 Δ 5,8,11,14 umsetzte.

Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedensten anderen Fettsäuren allein oder in Kombination (z.B. Linolsäure, 20:3 Δ -5,11,14-Fettsäure, alpha- oder gamma Linolensäure, Stearidon-säure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure etc.) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratspezifität und -Selektivität dieser Desaturasen durchgeführt werden.

Tabelle 8: Ergebnis der Coexpression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ -5-Acyl Lipid Desaturase und einer Δ -6 Elongase aus Moos in Hefe auf Basis der Expressionsvektoren pYes2 und pYes6

	pYes2-Elo		pYes2-Elo and pYes6-Ptd5	
	+18:3	+18:4	+18:3	+18:4
16:0	15,0	14,8	15,6	15,1
16:1 Δ 9	27,7	29,2	27,5	29,0
18:0	5,6	6,3	5,7	6,4
18:1 Δ 9	17,1	30,8	27,4	31,6
18:3 Δ 6,9,12	7,60	-	7,8	-
18:4 Δ 6,9,12,15	-	6,71	-	6,4
20:3 Δ 8,11,14	15,92	-	13,55	-
20:4 Δ 5,8,11,14	-	-	1,31	-
20:4 Δ 8,11,14,17	-	11,4	-	10,31
20:5 Δ 5,8,11,14,17	-	-	-	0,53

109

Aus den Substratumsetzungen geht hervor, dass die verwendete Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum* und die Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens* bzgl. der Substrataktivität und insbesondere der Substratspezifität geeignet sind, um Arachidon-
5 säure bzw. Eicosapentaensäure mithilfe erfindungsgemäßer Sequenzen zu produzieren.

Die Fragmentierungsmuster und Massenspektren von DMOX-Derivaten von Standards als auch den Peakfraktionen per GC identifizierter
10 Fettsäuren der in Tabelle 6, 7 und 8 aufgeführten, zeigen vergleichsweise identische Ergebnisse, wodurch die jeweilige Position der Doppelbindung über die bloße GC-Detektion hinaus abgesichert wurde.

15 Beispiel 18: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand
20 der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder
25 Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung
30 der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

35 Die Überstandsfraktion aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe
40 hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das
45 gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

110

Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J.E., & Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, insbesondere Dünnschichtchromatographie und Flammenionisationsdetektion (IATROSCAN, Iatron, Tokio, Japan), NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11:27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Äquivalente

Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Expressionskassette mit einer Struktur ausgewählt aus der
5 Gruppe:
- a) L1 - Promotor - Strukturgen - L2,
- b) L1 - Promotor - Strukturgen - L2 - L1 - Promotor - Struk-
10 turgen - L2,
- c) L1 - Promotor - Strukturgen - L2 - L1 - Promotor - Struk-
turgen - L2 - L1 - Promotor - Strukturgen - L2,
- 15 wobei L1, L2, Promotor und Strukturgen die folgende Bedeutung
hat:
- L1 = SEQ ID NO: 32 oder eine äquivalente Restriktionsschnitt-
stellen enthaltende Sequenz,
- 20 L2 = unabhängig voneinander SEQ ID NO: 33, 34 oder 35 oder
äquivalente Restriktionsschnittstellen enthaltende Se-
quenzen,
- Promotor = pflanzlicher Promotor
Strukturgen = eine in Pflanzen exprimierbare
25 Nukleinsäuresequenz.
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, wobei das Strukturgen
ein Biosynthesegen ist.
- 30 3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Struk-
turgen ein Biosynthesegen des Lipid- oder Fettsäurestoffwech-
sels ist.
4. Expressionskassette nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das
35 Strukturgen ein pflanzliches Gen ist.

40

Zeichn.

45

112

5. Expressionskassette nach den Ansprüche 1 bis 4, wobei das Gen eine Nukleinsäuresequenz ist, die für Proteine ausgewählt aus der Gruppe :
- 5 Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen,
- 10 Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n), kodiert.
6. Expressionskassette nach den Ansprüche 1 bis 5, wobei das Gen eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe ist:
- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische
- 30 Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
7. Verwendung von Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 in einem Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen dadurch gekennzeichnet, daß man die Expressionskassette in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt, anzieht und die in dem Organismus enthaltenen Fettsäureester isoliert.
- 40 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die durch das Verfahren hergestellten Fettsäureester mehrfach ungesättigte C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen
- 45 im Fettsäureester enthalten.

113

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei die C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids isoliert werden.
- 5 10. Verfahren nach den Ansprüchen 7 bis 9, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 7 bis 10, wobei die Fettsäure-ester C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit drei, vier oder fünf
10 Doppelbindungen im Fettsäureester enthalten.
12. Verfahren nach den Ansprüchen 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die in den Fettsäureestern enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren freisetzt.
- 15 13. Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 6.
14. Organismus enthaltend mindestens eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 oder mindestens einen Vektor gemäß
20 Anspruch 13.
15. Organismus nach Anspruch 14, wobei es sich bei dem Organismus um eine Pflanze handelt.
- 25 16. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz in einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 6.
- 30 17. Verwendung einer einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.

35

40

45

Figur 1: Polypeptidvergleich der Codierregionen von Pp_des 6 (obere Reihe) mit der EST-Sequenz von PT001078032R (untere Reihe)

```

398 WKPLVWMAVTELMMSGMLLGFFVFLSHNGMEVYNSSKEFVSAQI-----VSTR 444
      W+   + + +   + L +F LSHN   + S+   +A +               V T
430 WRVFGNIMLMGVAESLALAVLFSLSHN----FESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQVETS 263
445 DIKGNIFNDWFTGGLNRQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVY 494
      G   +   FTGGLN Q+EHLFP M           IAP+V   C KHG+ Y
262 CTYGGFLSGCFTGGLNFQVEHHLFPRMSSAWYXYIAPKVREICAKHGVHY 113

```

Figur 2: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001070010R

```

105 GVWVLAHECGHQSFSSTSKTLNN 126
      G WVLAHECGH +FS +++L +
533 GFWVLAHECGHGAFSKNRSLQD 598

```

Figur 2a: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001072031R

```

117 SFSTSKTLNNTVGWILHSMLLPYHSWRISHSKHH 151
      ++S S+T N+ VG+I+H LLVPY +W+ +H+KHH
465 AYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHH 569

```

Figur 3: Polypeptidvergleich von Codierregionen eines PCR Produktes aus Primerpaar F6a und R4a2 codierend für ein Desaturase Fragment (obere Reihe) aus *Phaodactylum* mit der Sequenz T36617 aus *Streptomyces coelicolor* (untere Reihe)

```

1   WWKNKHNGHHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLVKF 60
      WW++KH   HHA PN           +D DPDI   LL WS   QA++           +GL +
114 WWQDKHTRHHANPN-----TEDLDPDIGP-DLLVWSPDQARAA-----TGLPRL 156
61  MIRNQSYFYFPILLARLSWLNESFKCAFGLGAASENAALELKAKGLQYPLLEKAGILLH 120
      + R Q++ +FP+L L           E F           G A   N L+ +A           L+ A +L H
157 LGRWQAFLLFP LLTL-----EGFNLHVASGRAMANRRLKRR-----LDGALLAH 202
121 YAWMLTVSSGFGXXXXXXXXXXXXXXXXXCGFLLAIVFGLGHNGMATYNADARPDFWKLQ 180
      A LT   F                   G L   F   H GM   AD RPDF + Q
203 CAVYLTAL--FWVLPPGMAIAFLAVHQCLFGVYLGSAFAPNHKGMPILTADDRPDFLRRQ 260
181 VTTRNVTGGHGFPPQAFVDWFCGGLQYQVDHHLFPS 216
      V T+RNV GG           F D   GGL +Q++HHLFPS
261 VLTSRNVNGG-----LFTDLALGGLNHQIEHHLFPS 291

```


Figur 4: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6
(obere Reihe) verglichen mit Pt_des6 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      . |  |.
1 .....MGKGGDARASKG 12

      .
101 KKSTHPLS..EVAVHNKPSDCWIVVKNKVYDVSNFADEHPGGSVISTYFG 148
      . :| || | | ||: |||||. ||||. || |: |
13 STAARKISWQEVKTHASPEDAWIIHSNKVYDVSNW.HEHPGGAVIFTHAG 61

      .
149 RDGTDVFSFHAASWTKILQDFYIGDV..ERVEPTPELL...KDFREMRA 193
      | ||:|..||| . ::. ||||:. | | : : | :||:|
62 DDMTDIFAAFHAPGSQSLMKKFYIGELLPETTGKEPQQIAFEKGYRDLRS 111

      .
194 LFLREQLFKSSKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKTISAVLASACMMA 243
      : :|||. | :|| | |. |||. ||. |: :| |||| |:
112 KLIMGMFKSNKWFFYVYKCLSNMAIWAAACALVFYSDFVWHLASAVMLG 161

      .
244 LCFQQCGLSHDFLHNQVFETRNLNEVVGYYVIGNAVLGFSTGWWKEKHNL 293
      ||| |||. |||||. ||| | :. | || . |:| ||| |||
162 TFFQQSGWLAHDFLHHQVFTKRKHGDLGGLFWGNLMQGYSVQWWKNKHNG 211

      .
294 HHAAPN.ECDQTY.QPIDEDIDTLPLIAWS.....KDILATVENKTFL 334
      ||| || | | ||||:|:| ||| ::: | ..
212 HHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLV 261

      .
335 R.ILQYQHLLFFMGLLFFARGSWLFWWR.....YTSTAVLSPVDR... 373
      : ::. | |: :| || ||| |.: . | | :
262 KFMIRNQSYFYFPILLARLSWLNESFKCAFGLGAASENAALELKAKGLQ 311

      .
374 ..LLEKGTVLPHYFWFVGTTAC.YLLPGWKPLVWMAVTELMG.GMLLGFVF 419
      |||| :| || | . . :. . . | | || ||
312 YPLLEKAGILLHYAWMLTVSSGFGFRFSFAYTAFYFLTATASCGFLLAIVF 361

      .
420 VLSHNGMEVYNSS..KEFVSAQIVSTRDIKG.....NIFNDWFTGGLNRQ 462
      | |||| ||. :| |: .||.: | | ||| ||| |
362 GLGHNGMATYNADARPDFWKLQVTTTRNVTGGHGFPQAFVDWFCGGLQYQ 411

      .
463 IEHHLFPMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVSIATGTCKVLKALKE 512
      ::||| |.:||| | || |||. |. | : : || .|| |
412 VDHHLFPSLPRHNLAKTHALVESFCKEKGQYHEADLVDGTMEVLHHLGS 461

      .
513 VAEAAAEQHATTS.... 525
      || |
462 VAGEFVVDVFRDGPAM. 477

```

Figur 5: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6 (obere Reihe) verglichen mit Pt_des5 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      :| | .|...
1  .....MAPDADKLRQRQTAV 16
      .
101 KKSTHPLSEVAVHNKPSDC.....WIVVKNKVYDVSNFADEHPGGSVIS 144
      | | .: : :| | :||| |
17 AK..HNAATISTQERLCSLSSLKGEEVCIDGIIYDLQSF..DHPGGETIK 62
      .
145 TYFGRDGTDFVSSFHAASTWKILQDF.YIGDVERVEPTPELLKDF.REM. 191
      :| | | : | | | :| | . :| ||.
63 MFGGNDVTVQYKMIHPYHTEKHLEKMKRVGKVTDVFCEYKFDTEFEREIK 112
      .
192 RALFLREQLFKS.SKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKT.ISAVLASA 239
      | .| . | : : :|| | | | .|| |
113 REVFKIVRRGKDFGTLGWFFRAFCYIAIF..FYLQYHWVTTGTSWLLAVA 160
      .
240 CMMALCFQQCGLWSHDFLHNQVFETRWLNEVGVYIGNAVLGFSTGWWKE 289
      .. . || | . |.:..| :| :| | |.|
161 YGISQAMIGMN.VQHDANHGATSKRPVWNMDLGL..LGADFIGGSKWLWQE 207
      .
290 KHNHLHHAAPNECDQTYQPIDEDIDTLPLIAWSKDILATVENKTFRLRILQY 339
      .| ||| | : | : |::..| :|.| .:
208 QHWHTHAYTNHAEM..DP..DSFGAEPMLLFN.DYPLDHPARTWLH..RF 250
      .
340 QHLFFMGLLFFARGSWLFWWR.....YTSTAVLS...PVDRLLEKGTVL 381
      | |:| .| || | || .|
251 QAFFYMPVL...AGYWLSAVFNPQILDQLQRGALSVGIRLDNAFIHSRRK 297
      .
382 FHYFW...FVG....TACYLLPG....WKPLVWMAVTELMGMLLGFVFV 420
      : || :: | | |: . . :| | .|
298 YAVFWRAVYIAVNVIAPFYTNSSGLEWSWRVFGNIMLMGVAESLALAVLFS 347
      .
421 LSHN.....GMEVYNSSKEFVSAQIVSTRDIKGNIFNDWFTGGLN 460
      |||| :. :. || | | . |||||
348 LSHNFESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQ.VETSCTYGGFLSGCFTGGLN 396
      .
461 RQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVS.IATGTCKVLKA 509
      |:||||| | |||: | |||. | | .:
397 FQVEHHLFPRMSSAWYPYIAPKVREICAKHGVHYAYYPWIHQNFLSTVRY 446
      .
510 LKEVAEAAA.EQHATTS..... 525
      : | | | . |
447 MHAAGTGANWROMARENPLTGRA. 469

```

Figur 6: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tricornutum* (Pt_des12) in der unteren Reihe

```

40 KEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASLL..FLAATQIDKFE..NP 85
   |::|  ||  |||  : |::: | :|  . | : : ||
107 KDLRAVIPKDCFEPDTAKSLGYLSVS.TMGTILCSVVGANLLSVLDPSNP 155
   .
   .
86 LIRYLAWPVYWIMQGIVCTGVVWLAHECGHQSFSSTSKTLNNTVGVWILHSM 135
   | : | | . | | |.||||||| |. || .:| . ||::||.
156 L.TWPLWAAYGAVTGTVMGLWVLAHECGHGAFSKNRS LQDAVGYYIHSI 204
   .
   .
136 LLVPYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFPKTRSQVGLPPKENAAAVQE 185
   :||| | |. ||. ||. | | : || . | | . | |
205 MLVPYFSWQRSHAVHHQYTNHME LGETHVPDRADKEG....EKSLALRQF 250
   .
   .
186 EDMSVHLDEEAPIVT LFWMVIQFLFGWPAYLIMNASGQDYGRWTS HFHTY 235
   | |. : : |||||: . |. |. ||:
251 MLDSFGKDKGMKAYGGLQSFLHLIVGWPAYLLIGATGGPDRGMTNHFYP. 299
   .
   .
236 SPIFEP....RNFF.....DIIISDLGVLAALGALIYASMQLSLLTVTK 275
   .|: | : | : ||::| |. ||| . | |
300 NPLSTPTQPKKELFPGNWKEKVYQSDIGIAAVVGALIAWTATSG LAPVMA 349
   .
   .
276 YYIVPYL FVNFWLV LITFLQHTDPKLPHYREGAWN FQRGALCTVDRSFGK 325
   | | : :| ||| |. |||| |. ||: || :|| |::| : |
350 LYGGPLIVINAWLVLYTWLQHTD TDVPHFSSDNHNFVK GALHTIDRPFYDK 399
   .
   .
326 .....FLDHMFHGIVH THVAHHLFSQMPFYHAE EATYHLKKLLGEYYVYD 370
   :| : | | ||||| | . | | : || :| | |. ||
400 LDPWGIIDFLH HKIGTTHVAHHFDSTIPHYKAQIATDAIKAKFPEVYLYD 449
   .
   .
371 PSPIVVAVWRSFRECRFVEDQGDVVFFK 398
   |. || |. || : | || . || . |
450 PTPIPQAMWRVAKGCTAVEQRGDAWVWK 477

```

Figur 7: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tri-cornutum* Klon PT001072031R (Pt_des12.2) in der unteren Reihe.

```

22 NSAKPAFERNYQLPEFTIKEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASL 71
   .| | . . :|| | :|: || ||:| | :. || |.
33 SSYNPLAKDSPELP..TKGQIKAVIPKECFQRSAFWSTFYLMRDLAMAAA 80

72 LFLAATQIDKFENP.....LIRYLAWPVYIMQGIVCTGVWVLAHECGH 115
   .|: : | | | | | | : || ||.|||||
81 FCYGTSQVLSTDLPQDATLILPWALGWGVYAFWMGTILTGPWVVAHECGH 130

116 QSFSTSKTLNNTVGWILHSMMLVPYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFVP 165
   .:| |. | |. ||. |. | |||| |. |. |. ||: | |: : ||
131 GAYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHHRRTNHLVDGESHPV 180

166 KTRSQVGLPP..KENAAAVQEEDMSVHLDEEAPIVTLFWMVIOFLFGWP 213
   | || | . |. | | | : | | | |||
181 STAKDNGLGPHNERNNSFYAAWHEAMG....DGAFVAVQVWS..HLFVGWP 224

214 AYLI.MNASGQ..DYGRW.....TSHFHTYSPIFEPRNFFDIIISDLG 253
   || : ..|. | | || ||. | : | :|
225 LYLAGLASTGKLAHEGWWLEERNAIADHFRPSSPMFPAKIRAKIALSSAT 274

254 VLAALGALIYASMQLSLLTVTKYYIVPYLFVNFWLVLITFLQHTDPKLP 303
   || | |:| |. | | :| || ||| |||| |. ||||| :||
275 ELAVLAGLLYVGTQVGHLPVLLWYWGPTYFVNWLVLTYTLQHTDPSIPH 324

304 YREGAWNFRQALCTVDRSFGKFLDHMFHGVHVAHHLFSQMPFYHAE 353
   | || | . :||| |:|| :| | | | | || |||| :||. |. |
325 YGEGEWTWVKGALSTIDRDYGIF.DFFHHTIGSTHVHHLFHEMPWYNAG 373

354 EATYHLKLLGE..YVYDPSPIVAVWRSFREC RFVEDQGDVVFFK 398
   || .|. | | |||. | |. || | | :|| | :||
374 IATQKVKEFLEPQGLYNDPTPWYKAMWRIARTCHYVESNEGVQYFK 420

```

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Expression von Biosynthesegenen in
pflanzlichen Samen unter Verwendung von neuen
multiplene Expressionskonstrukten

<130> 2000_904

<140> 2000_904

<141> 2000-12-22

<160> 35

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1652

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricornutum

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1524)

<400> 1

```

gacccaacaa acccaacaat cccaacaatc ccatacaacag gaattggggtt tcgttgagtc 60
aataattgct agaatccaaa cagacagaca gagaccaacc gcattctatta caga atg 117
                                         Met
                                         1

gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg 165
Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala
                    5                10                15

aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg 213
Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu
                20                25                30

tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac 261
Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp
                35                40                45

ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt 309
Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly
                50                55                60                65

ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat acc 357
Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr
                    70                75                80

gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc 405
Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe
                    85                90                95

gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga 453

```

Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys	Arg		
	100						105					110					
gaa	gtc	ttc	aag	att	gtg	cga	cga	ggc	aag	gat	ttc	ggc	act	ttg	gga	501	
Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	Gly		
	115					120					125						
tggt	ttc	ttc	cgt	gcg	ttt	tgc	tac	att	gcc	att	ttc	ttc	tac	ctg	cag	549	
Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu	Gln		
130					135				140						145		
tac	cat	tggt	gtc	acc	acg	gga	acc	tct	tggt	ctg	ctg	gcc	gtg	gcc	tac	597	
Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Tyr		
				150					155					160			
gga	atc	tcc	caa	gcg	atg	att	ggc	atg	aat	gtc	cag	cac	gat	gcc	aac	645	
Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala	Asn		
			165					170					175				
cac	ggg	gcc	acc	tcc	aag	cgt	ccc	tggt	gtc	aac	gac	atg	cta	ggc	ctc	693	
His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Leu		
		180					185					190					
ggc	gcg	gat	ttt	att	ggc	ggc	tcc	aag	tggt	ctc	tggt	cag	gaa	caa	cac	741	
Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln	His		
195						200					205						
tggt	acc	cac	cac	gct	tac	acc	aat	cac	gcc	gag	atg	gat	ccc	gat	agc	789	
Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp	Ser		
210					215					220				225			
ttt	ggc	gcc	gaa	cca	atg	ctc	cta	ttc	aac	gac	tat	ccc	ttg	gat	cat	837	
Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp	His		
				230					235					240			
ccc	gct	cgt	acc	tggt	cta	cat	cgc	ttt	caa	gca	ttc	ttt	tac	atg	ccc	885	
Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met	Pro		
			245					250					255				
gtc	ttg	gct	gga	tac	tggt	ttg	tcc	gct	gtc	ttc	aat	cca	caa	att	ctt	933	
Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile	Leu		
	260						265					270					
gac	ctc	cag	caa	cgc	ggc	gca	ctt	tcc	gtc	ggc	atc	cgt	ctc	gac	aac	981	
Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp	Asn		
	275					280					285						
gct	ttc	att	cac	tgc	cga	cgc	aag	tat	gcg	gtt	ttc	tggt	cgg	gct	gtg	1029	
Ala	Phe	Ile	His	Ser	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Val	Phe	Trp	Arg	Ala	Val		
290					295					300				305			
tac	att	gcg	gtg	aac	gtg	att	gct	ccg	ttt	tac	aca	aac	tcc	ggc	ctc	1077	
Tyr	Ile	Ala	Val	Asn	Val	Ile	Ala	Pro	Phe	Tyr	Thr	Asn	Ser	Gly	Leu		
				310				315						320			
gaa	tggt	tcc	tggt	cgt	gtc	ttt	gga	aac	atc	atg	ctc	atg	ggc	gtg	gcg	1125	
Glu	Trp	Ser	Trp	Arg	Val	Phe	Gly	Asn	Ile	Met	Leu	Met	Gly	Val	Ala		
			325					330					335				

gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc gaa 1173
 Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu
 340 345 350
 tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca 1221
 Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro
 355 360 365
 gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga 1269
 Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly
 370 375 380 385
 ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac 1317
 Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His
 390 395 400
 cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc 1365
 His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro
 405 410 415
 aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac 1413
 Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr
 420 425 430
 ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg 1461
 Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala
 435 440 445
 gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg 1509
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu
 450 455 460 465
 acc gga cgg gcg taa aagtacacga cagacacaaa ggtggcgtat ggtgatctct 1564
 Thr Gly Arg Ala
 470
 agaaaacaga catagcctac tggaaatatc gacgtccaaa caataatttt aaagactatt 1624
 tttctgcgta aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1652

<210> 2
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 2
 Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe

50		55		60
Gly 65	Gly Asn Asp Val Thr 70	Val Gln Tyr Lys Met 75	Ile His Pro Tyr His 80	
Thr 85	Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp 95			
Phe 100	Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys 110			
Arg 115	Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu 125			
Gly 130	Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu 140			
Gln 145	Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala 160			
Tyr 165	Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala 175			
Asn 180	His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly 190			
Leu 195	Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln 205			
His 210	Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp 220			
Ser 225	Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp 240			
His 245	Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met 255			
Pro 260	Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile 270			
Leu 275	Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp 285			
Asn 290	Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala 300			
Val 305	Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly 320			
Leu 325	Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val 335			
Ala 340	Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe 350			
Glu 355	Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu 365			

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
465

<210> 3

<211> 1434

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

<400> 3

atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg gcg gct 48
Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala
1 5 10 15

cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg gag gac 96
Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp
20 25 30

gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac tgg cac 144
Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His
35 40 45

gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt gac gac atg 192
Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met
50 55 60

acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg ctc atg 240
Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met
65 70 75 80

aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc aag gag 288
Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu
85 90 95

ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg cgc tcc aaa 336

Pro	Gln	Gln	Ile	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Tyr	Arg	Asp	Leu	Arg	Ser	Lys	
			100					105					110			
ctc	atc	atg	atg	ggc	atg	ttc	aag	tcc	aac	aag	tgg	ttc	tac	gtc	tac	384
Leu	Ile	Met	Met	Gly	Met	Phe	Lys	Ser	Asn	Lys	Trp	Phe	Tyr	Val	Tyr	
		115					120					125				
aag	tgc	ctc	agc	aac	atg	gcc	att	tgg	gcc	gcc	gcc	tgt	gct	ctc	gtc	432
Lys	Cys	Leu	Ser	Asn	Met	Ala	Ile	Trp	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Leu	Val	
		130				135					140					
ttt	tac	tcg	gac	cgc	ttc	tgg	gta	cac	ctg	gcc	agc	gcc	gtc	atg	ctg	480
Phe	Tyr	Ser	Asp	Arg	Phe	Trp	Val	His	Leu	Ala	Ser	Ala	Val	Met	Leu	
145					150					155					160	
gga	aca	ttc	ttt	cag	cag	tcg	gga	tgg	ttg	gca	cac	gac	ttt	ctg	cac	528
Gly	Thr	Phe	Phe	Gln	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu	Ala	His	Asp	Phe	Leu	His	
				165					170					175		
cac	cag	gtc	ttc	acc	aag	cgc	aag	cac	ggg	gat	ctc	gga	gga	ctc	ttt	576
His	Gln	Val	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe	
			180					185					190			
tgg	ggg	aac	ctc	atg	cag	ggt	tac	tcc	gta	cag	tgg	tgg	aaa	aac	aag	624
Trp	Gly	Asn	Leu	Met	Gln	Gly	Tyr	Ser	Val	Gln	Trp	Trp	Lys	Asn	Lys	
		195					200					205				
cac	aac	gga	cac	cac	gcc	gtc	ccc	aac	ctc	cac	tgc	tcc	tcc	gca	gtc	672
His	Asn	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	His	Cys	Ser	Ser	Ala	Val	
	210					215					220					
gcg	caa	gat	ggg	gac	ccg	gac	atc	gat	acc	atg	ccc	ctt	ctc	gcc	tgg	720
Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Thr	Met	Pro	Leu	Leu	Ala	Trp	
225					230				235					240		
tcc	gtc	cag	caa	gcc	cag	tct	tac	cgg	gaa	ctc	caa	gcc	gac	gga	aag	768
Ser	Val	Gln	Gln	Ala	Gln	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	
				245				250					255			
gat	tcg	ggt	ttg	gtc	aag	ttc	atg	atc	cgt	aac	caa	tcc	tac	ttt	tac	816
Asp	Ser	Gly	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ile	Arg	Asn	Gln	Ser	Tyr	Phe	Tyr	
			260					265					270			
ttt	ccc	atc	ttg	ttg	ctc	gcc	cgc	ctg	tcg	tgg	ttg	aac	gag	tcc	ttc	864
Phe	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe	
		275					280					285				
aag	tgc	gcc	ttt	ggg	ctt	gga	gct	gcg	tcg	gag	aac	gct	gct	ctc	gaa	912
Lys	Cys	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu	
		290				295					300					
ctc	aag	gcc	aag	ggt	ctt	cag	tac	ccc	ctt	ttg	gaa	aag	gct	ggc	atc	960
Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	
305					310				315					320		
ctg	ctg	cac	tac	gct	tgg	atg	ctt	aca	gtt	tcg	tcc	ggc	ttt	gga	cgc	1008
Leu	Leu	His	Tyr	Ala	Trp	Met	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	
				325					330					335		

Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu
 85 90 95
 Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys
 100 105 110
 Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val
 130 135 140
 Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
 165 170 175
 His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe
 180 185 190
 Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys
 195 200 205
 His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val
 210 215 220
 Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys
 245 250 255
 Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr
 260 265 270
 Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe
 275 280 285
 Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu
 290 295 300
 Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile
 305 310 315 320
 Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg
 325 330 335
 Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser
 340 345 350
 Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met
 355 360 365
 Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val
 370 375 380

Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe
385 390 395 400

Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu
405 410 415

Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val
420 425 430

Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu
435 440 445

Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly
450 455 460

Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met
465 470 475

<210> 5

<211> 1651

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(1554)

<400> 5

gaagaaggaa catataaaag taagccatct cctcggcacc atctaaagac ctaatatcta 60

ctcgtc atg gtt cgc ttt tca aca gcc gct cta ctt tct ctg tcg aca 108
Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr
1 5 10

ttg aca act tca tgt att ggt gcc ttc cag ctg tct tcg cca gca caa 156
Leu Thr Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln
15 20 25 30

ctt ccg aca agt agg ctt cgt cgg cat acg aac acg gcg ccg ctt tcg 204
Leu Pro Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser
35 40 45

gcc gtg gcc gtc gac tcc ggt tct tcc gat ccg gcc ttg gta ggc aac 252
Ala Val Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn
50 55 60

ctc ccc ctt ccc aac aac aat gat aat gag gac aag aac cgt aga atg 300
Leu Pro Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met
65 70 75

cca atg atg gac ttg aaa ggt att gct ctg tct ggt ctc aaa ggg caa 348
Pro Met Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln
80 85 90

gct ctt tcc gtc cga gcg gaa gat ttt cct cag gcg aaa gac ttg cgt 396
Ala Leu Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg
95 100 105 110

gcc gtc att ccg aaa gat tgc ttc gaa ccc gac acg gcc aaa tcg ttg	444
Ala Val Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu	
115 120 125	
gga tat ctt tcc gtt tca act atg ggg aca att ctc tgc tcc gtc gtc	492
Gly Tyr Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val	
130 135 140	
ggc gcg aac ctc ctt agt gtg ctc gat ccc tcc aat cca tta acc tgg	540
Gly Ala Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp	
145 150 155	
cct ctc tgg gcg gcc tac ggt gcc gtc acg ggg acg gtc gcc atg ggg	588
Pro Leu Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly	
160 165 170	
ctt tgg gtg ctg gcc cac gaa tgc gga cac ggc gcc ttt tcc aaa aac	636
Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn	
175 180 185 190	
cga tcc ctc cag gat gcc gtg ggg tac att atc cat tcc atc atg ctg	684
Arg Ser Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu	
195 200 205	
gtg cca tac ttt agt tgg cag cga tgc cat gcc gtg cat cac cag tat	732
Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr	
210 215 220	
acc aat cat atg gaa ctg ggg gaa aca cac gtt cct gat cga gcc gat	780
Thr Asn His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp	
225 230 235	
aag gag ggc gag aag agc ctg gcg ctc cgc cag ttc atg ttg gat tcc	828
Lys Glu Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser	
240 245 250	
ttt ggt aaa gac aag ggc atg aaa gca tac gga ggc ctc cag tgc ttt	876
Phe Gly Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe	
255 260 265 270	
ttg cat ctc atc gtg gga tgg cca gcc tac ctc ctg atc ggt gcg acc	924
Leu His Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr	
275 280 285	
ggt gga ccc gac cgt ggt atg acc aac cat ttt tat ccc aac cct ttg	972
Gly Gly Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu	
290 295 300	
tcg acg cca aca cag ccc aag aaa gaa ctt ttc cct ggg aac tgg aaa	1020
Ser Thr Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys	
305 310 315	
gaa aag gtc tac cag tca gat att gga atc gcc gcc gtt gtc ggc gcc	1068
Glu Lys Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala	
320 325 330	
ctc att gct tgg acc gcc act tcg ggt cta gcc ccc gtc atg gcc ttg	1116

11

Leu Ile Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu
 335 340 345 350
 tac ggt ggt ccc ttg atc gtc att aat gcc tgg ctg gta ctg tac acg 1164
 Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr
 355 360 365
 tgg ttg caa cat aca gat acc gat gtt ccg cac ttt tcc tcc gac aac 1212
 Trp Leu Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn
 370 375 380
 cac aac ttt gtc aag ggc gca ctg cat acg atc gat cgt ccc tac gac 1260
 His Asn Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp
 385 390 395
 aaa ctt gat ccc tgg gga atc ata gac ttt ctg cac cac aag att gga 1308
 Lys Leu Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly
 400 405 410
 aca acg cat gtg gca cac cat ttt gac agt act atc ccc cac tat aag 1356
 Thr Thr His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys
 415 420 425 430
 gct cag att gct acc gat gcc atc aaa gcc aag ttt cca gaa gtg tac 1404
 Ala Gln Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr
 435 440 445
 ctc tat gac ccg aca cca att cca caa gcc atg tgg cgc gtc gcc aag 1452
 Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys
 450 455 460
 gga tgt act gca gta gag caa cgc ggt gac gcc tgg gtg tgg aaa aac 1500
 Gly Cys Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn
 465 470 475
 gaa gga ata gaa gat ttg gtg gaa cat cgt caa agc aaa tta tcg agc 1548
 Glu Gly Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser
 480 485 490
 gaa taa agcaacatat cgctttatgg aagaacaaac gtccattgtg taaaaccctg 1604
 Glu
 495
 ataatttcaa tattgtgttt tgttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1651

<210> 6

<211> 495

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 6

Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln Leu Pro
 20 25 30

Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser Ala Val
 35 40 45
 Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn Leu Pro
 50 55 60
 Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met Pro Met
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln Ala Leu
 85 90 95
 Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg Ala Val
 100 105 110
 Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu Gly Tyr
 115 120 125
 Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val Gly Ala
 130 135 140
 Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp Pro Leu
 145 150 155 160
 Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly Leu Trp
 165 170 175
 Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn Arg Ser
 180 185 190
 Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu Val Pro
 195 200 205
 Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr Thr Asn
 210 215 220
 His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp Lys Glu
 225 230 235 240
 Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser Phe Gly
 245 250 255
 Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe Leu His
 260 265 270
 Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr Gly Gly
 275 280 285
 Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu Ser Thr
 290 295 300
 Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala Leu Ile
 325 330 335
 Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu Tyr Gly

340	345	350	
Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu			
355	360	365	
Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn His Asn			
370	375	380	
Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp Lys Leu			
385	390	395	400
Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly Thr Thr			
405	410	415	
His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys Ala Gln			
420	425	430	
Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr Leu Tyr			
435	440	445	
Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys Gly Cys			
450	455	460	
Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn Glu Gly			
465	470	475	480
Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser Glu			
485	490	495	
<210> 7			
<211> 1578			
<212> DNA			
<213> Physcomitrella patens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(1578)			
<400> 7			
atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac			48
Met Val Phe Ala Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn			
1	5	10	15
atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc			96
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe			
20	25	30	
agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa			144
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln			
35	40	45	
cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc			192
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala			
50	55	60	
gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga			240
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly			

65	70	75	80	
act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg				288
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg				
	85	90	95	
tca tct cag tgg aag aag tgc aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta				336
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val				
	100	105	110	
cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat				384
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr				
	115	120	125	
gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt				432
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser				
	130	135	140	
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca				480
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala				
	145	150	155	160
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag				528
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu				
	165	170	175	
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga				576
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg				
	180	185	190	
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tgc aaa ttg tac tat				624
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr				
	195	200	205	
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca				672
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala				
	210	215	220	
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt				720
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys				
	225	230	235	240
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt				768
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe				
	245	250	255	
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg				816
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly				
	260	265	270	
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag				864
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys				
	275	280	285	
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act				912
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr				
	290	295	300	

15

tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg	960
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp	
305 310 315 320	
agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc	1008
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile	
325 330 335	
ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt	1056
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg	
340 345 350	
ggt agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc	1104
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	
355 360 365	
tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac	1152
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	
370 375 380	
ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca	1200
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	
385 390 395 400	
tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc	1248
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	
405 410 415	
ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tgc tct	1296
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	
420 425 430	
aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga	1344
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	
435 440 445	
aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag	1392
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	
450 455 460	
cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca	1440
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala	
465 470 475 480	
cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac	1488
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp	
485 490 495	
gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa	1536
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu	
500 505 510	
gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa	1578
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser	
515 520 525	

<211> 525

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 8

Met	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	1	5	10	15
Ile	Asp	Val	Glu	His	Ile	Ala	Ser	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Asp	Phe	Phe	20	25	30	
Ser	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Trp	Ser	Val	His	Ser	Ile	Gln	35	40	45	
Pro	Leu	Lys	Arg	Leu	Thr	Ser	Lys	Lys	Arg	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Ala	50	55	60	
Val	Gln	Cys	Ile	Ser	Ala	Glu	Val	Gln	Arg	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Gly	65	70	75	80
Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Thr	Arg	Arg	Arg	85	90	95	
Ser	Ser	Gln	Trp	Lys	Lys	Ser	Thr	His	Pro	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Val	100	105	110	
His	Asn	Lys	Pro	Ser	Asp	Cys	Trp	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Lys	Val	Tyr	115	120	125	
Asp	Val	Ser	Asn	Phe	Ala	Asp	Glu	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	130	135	140	
Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	His	Ala	145	150	155	160
Ala	Ser	Thr	Trp	Lys	Ile	Leu	Gln	Asp	Phe	Tyr	Ile	Gly	Asp	Val	Glu	165	170	175	
Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Pro	Glu	Leu	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Glu	Met	Arg	180	185	190	
Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Leu	Tyr	Tyr	195	200	205	
Val	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	210	215	220	
Ile	Ile	Cys	Trp	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	225	230	235	240
Met	Met	Ala	Leu	Cys	Phe	Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ser	His	Asp	Phe	245	250	255	
Leu	His	Asn	Gln	Val	Phe	Glu	Thr	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Val	Val	Gly	260	265	270	
Tyr	Val	Ile	Gly	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Trp	Lys	275	280	285	

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
 290 295 300
 Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
 325 330 335
 Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
 340 345 350
 Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
 355 360 365
 Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
 370 375 380
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
 405 410 415
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
 420 425 430
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 450 455 460
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
 485 490 495
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
 500 505 510
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 515 520 525

<210> 9

<211> 873

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(873)

<400> 9

atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 48

Met	Glu	Val	Val	Glu	Arg	Phe	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	Val	Ser	
1				5					10					15		
cag	ggc	gtg	aat	gca	ttg	ctg	ggc	agt	ttt	ggg	gtg	gag	ttg	acg	gat	96
Gln	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	
			20					25					30			
acg	ccc	act	acc	aaa	ggc	ttg	ccc	ctc	gtt	gac	agt	ccc	aca	ccc	atc	144
Thr	Pro	Thr	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Ser	Pro	Thr	Pro	Ile	
			35				40					45				
gtc	ctc	ggc	gtt	tct	gta	tac	ttg	act	att	gtc	att	gga	ggg	ctt	ttg	192
Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	
	50					55					60					
tgg	ata	aag	gcc	agg	gat	ctg	aaa	ccg	cgc	gcc	tcg	gag	cca	ttt	ttg	240
Trp	Ile	Lys	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Ser	Glu	Pro	Phe	Leu	
65					70					75					80	
ctc	caa	gct	ttg	gtg	ctt	gtg	cac	aac	ctg	ttc	tgt	ttt	gcg	ctc	agt	288
Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Val	His	Asn	Leu	Phe	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser	
				85					90					95		
ctg	tat	atg	tgc	gtg	ggc	atc	gct	tat	cag	gct	att	acc	tgg	cgg	tac	336
Leu	Tyr	Met	Cys	Val	Gly	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr	
			100					105					110			
tct	ctc	tgg	ggc	aat	gca	tac	aat	cct	aaa	cat	aaa	gag	atg	gcg	att	384
Ser	Leu	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Ala	Ile	
		115					120					125				
ctg	gta	tac	ttg	ttc	tac	atg	tct	aag	tac	gtg	gaa	ttc	atg	gat	acc	432
Leu	Val	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	
	130					135					140					
gtt	atc	atg	ata	ctg	aag	cgc	agc	acc	agg	caa	ata	agc	ttc	ctc	cac	480
Val	Ile	Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Phe	Leu	His	
145				150						155				160		
gtt	tat	cat	cat	tct	tca	att	tcc	ctc	att	tgg	tgg	gct	att	gct	cat	528
Val	Tyr	His	His	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Trp	Ala	Ile	Ala	His	
				165					170					175		
cac	gct	cct	ggc	ggc	gaa	gca	tat	tgg	tct	gcg	gct	ctg	aac	tca	gga	576
His	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Trp	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly	
			180					185					190			
gtg	cat	gtt	ctc	atg	tat	gcg	tat	tac	ttc	ttg	gct	gcc	tgc	ctt	cga	624
Val	His	Val	Leu	Met	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg	
		195				200						205				
agt	agc	cca	aag	tta	aaa	aat	aag	tac	ctt	ttt	tgg	ggc	agg	tac	ttg	672
Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	
	210					215					220					
aca	caa	ttc	caa	atg	ttc	cag	ttt	atg	ctg	aac	tta	gtg	cag	gct	tac	720
Thr	Gln	Phe	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Asn	Leu	Val	Gln	Ala	Tyr	
225					230					235					240	

tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 768
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 816
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 864
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

act gag tga 873
 Thr Glu
 290

<210> 10

<211> 290

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 10

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly

180	185	190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg		
195	200	205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu		
210	215	220
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr		
225	230	235
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile		
245	250	255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr		
260	265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys		
275	280	285
Thr Glu		
290		

<210> 11
 <211> 1526
 <212> DNA
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<220>
 <221> CDS
 <222> (92)..(1402)

<400> 11
 gcttcggtta gcgtcccata gtttgttaca cttggctgtg aaacgaatac gttcttggtc 60
 tacttactac aacgaagcaa ccaccagcag c atg ggt aag gga ggt caa cga 112
 Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg
 1 5
 gct gta gct ccc aag agt gcc acc agc tct act ggc agt gct acc ctt 160
 Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu
 10 15 20
 agc caa agc aag gaa cag gta tgg act tcg tcg tac aac cct ctg gcg 208
 Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala
 25 30 35
 aag gat tcc ccg gag ctg cca acc aaa ggc caa atc aag gcc gtc att 256
 Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile
 40 45 50 55
 ccg aag gaa tgt ttc caa cgc tca gcc ttt tgg tct acc ttc tac ctg 304
 Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu
 60 65 70
 atg cgc gat ctc gcc atg gct gcc gcc ttt tgc tac gga acc tca cag 352
 Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln

75	80	85	
gtc ctc tcc acc gac ctt ccc caa gac gcc acg ctc att ctg ccc tgg Val Leu Ser Thr Asp Leu Pro Gln Asp Ala Thr Leu Ile Leu Pro Trp 90 95 100			400
gct ctc ggc tgg ggc gtc tac gcc ttt tgg atg gga acc att ctc acc Ala Leu Gly Trp Gly Val Tyr Ala Phe Trp Met Gly Thr Ile Leu Thr 105 110 115			448
ggg cct tgg gta gtt gcg cac gaa tgt gga cac ggc gct tac tcc gac Gly Pro Trp Val Val Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Tyr Ser Asp 120 125 130 135			496
tcc cag acg ttc aat gac gtg gtc ggc ttt atc gtc cac caa gct ttg Ser Gln Thr Phe Asn Asp Val Val Gly Phe Ile Val His Gln Ala Leu 140 145 150			544
ctc gtc ccc tac ttt gcc tgg cag tac acc cac gcg aaa cac cac cgt Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr Thr His Ala Lys His His Arg 155 160 165			592
cga acc aac cat ctg gtg gac ggc gag tcc cac gtc cct tct acc gcc Arg Thr Asn His Leu Val Asp Gly Glu Ser His Val Pro Ser Thr Ala 170 175 180			640
aag gat aac ggc ctc ggg ccg cac aac gag cga aac tcc ttc tac gcc Lys Asp Asn Gly Leu Gly Pro His Asn Glu Arg Asn Ser Phe Tyr Ala 185 190 195			688
gcg tgg cac gag gcc atg gga gac ggc gcc ttt gcc gtc ttt caa gtc Ala Trp His Glu Ala Met Gly Asp Gly Ala Phe Ala Val Phe Gln Val 200 205 210 215			736
tgg tcg cac ttg ttc gtc ggc tgg cct ctc tac ttg gcc ggt ctg gcc Trp Ser His Leu Phe Val Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Gly Leu Ala 220 225 230			784
agt acc gga aag ctt gcg cac gaa ggt tgg tgg ctg gaa gaa cgg aac Ser Thr Gly Lys Leu Ala His Glu Gly Trp Trp Leu Glu Glu Arg Asn 235 240 245			832
gcg att gcg gat cac ttt cga ccc agc tct ccc atg ttc ccc gcc aag Ala Ile Ala Asp His Phe Arg Pro Ser Ser Pro Met Phe Pro Ala Lys 250 255 260			880
atc cgt gcc aag att gcc ctt tcc agc gcg acg gaa ctc gcc gtg ctc Ile Arg Ala Lys Ile Ala Leu Ser Ser Ala Thr Glu Leu Ala Val Leu 265 270 275			928
gct gga ctc ttg tat gtc ggt aca cag gtc gga cac ctt ccc gtc ctg Ala Gly Leu Leu Tyr Val Gly Thr Gln Val Gly His Leu Pro Val Leu 280 285 290 295			976
ctg tgg tac tgg gga ccg tac acc ttt gtc aac gct tgg ctt gta ctc Leu Trp Tyr Trp Gly Pro Tyr Thr Phe Val Asn Ala Trp Leu Val Leu 300 305 310			1024

tac acg tgg ctg cag cat acg gac ccg tcc atc ccg cac tac ggt gaa 1072
 Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu
 315 320 325

ggc gag tgg acc tgg gtc aag ggc gcg ctc tct acc att gat cga gac 1120
 Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp
 330 335 340

tac ggc atc ttc gat ttc ttt cac cac acc atc ggt tcc acg cac gtg 1168
 Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Thr Ile Gly Ser Thr His Val
 345 350 355

gta cac cat ttg ttc cac gaa atg ccc tgg tac aat gcc ggc att gcc 1216
 Val His His Leu Phe His Glu Met Pro Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala
 360 365 370 375

acg caa aag gtc aag gaa ttt ttg gaa ccc cag ggc ttg tac aat tac 1264
 Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr
 380 385 390

gat ccg acc ccc tgg tac aag gcc atg tgg cgc att gcc cgg acc tgt 1312
 Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys
 395 400 405

cac tat gtg gag tca aac gag ggt gtg cag tat ttc aag agt atg gaa 1360
 His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu
 410 415 420

aac gtg ccg ctg act aag gat gtg cga aac aaa gcc gca tga 1402
 Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg Asn Lys Ala Ala
 425 430 435

gaaaaagtgc caccgacgca taattttaca atcctaccaa caagaccaac attatatggt 1462

tttcgcttaa aagatagttt tttctaccat ctgtgtagtc ggcacaaaaa aaaaaaaaaa 1522

aaaa 1526

<210> 12

<211> 436

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 12

Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr
 20 25 30

Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys
 35 40 45

Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala
 50 55 60

Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala

65	70	75	80
Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln Val Leu Ser Thr Asp Leu Pro Gln Asp	85	90	95
Ala Thr Leu Ile Leu Pro Trp Ala Leu Gly Trp Gly Val Tyr Ala Phe	100	105	110
Trp Met Gly Thr Ile Leu Thr Gly Pro Trp Val Val Ala His Glu Cys	115	120	125
Gly His Gly Ala Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Phe Asn Asp Val Val Gly	130	135	140
Phe Ile Val His Gln Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr	145	150	155
Thr His Ala Lys His His Arg Arg Thr Asn His Leu Val Asp Gly Glu	165	170	175
Ser His Val Pro Ser Thr Ala Lys Asp Asn Gly Leu Gly Pro His Asn	180	185	190
Glu Arg Asn Ser Phe Tyr Ala Ala Trp His Glu Ala Met Gly Asp Gly	195	200	205
Ala Phe Ala Val Phe Gln Val Trp Ser His Leu Phe Val Gly Trp Pro	210	215	220
Leu Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Ser Thr Gly Lys Leu Ala His Glu Gly	225	230	235
Trp Trp Leu Glu Glu Arg Asn Ala Ile Ala Asp His Phe Arg Pro Ser	245	250	255
Ser Pro Met Phe Pro Ala Lys Ile Arg Ala Lys Ile Ala Leu Ser Ser	260	265	270
Ala Thr Glu Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Tyr Val Gly Thr Gln	275	280	285
Val Gly His Leu Pro Val Leu Leu Trp Tyr Trp Gly Pro Tyr Thr Phe	290	295	300
Val Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro	305	310	315
Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala	325	330	335
Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His	340	345	350
Thr Ile Gly Ser Thr His Val Val His His Leu Phe His Glu Met Pro	355	360	365
Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu	370	375	380

Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met
385 390 395 400

Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val
405 410 415

Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg
420 425 430

Asn Lys Ala Ala
435

<210> 13

<211> 3598

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 13

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tottcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgtttt gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgcaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga ttttaattgtt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgccc tgtggaaagt 900
ttaaaaaatat ttgggaaatg atttgcattg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct 1020

atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
 taattttcttc atagccagcc caccgcggtg ggcggccgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140
 gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200
 gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctgagatcct taccgcggtt ttcggttcat 1260
 tctaataaat atatcacccg ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt 1320
 tactgattgt ccgtcgacga attcgagctc ggcgcgcaa gcttggcgta atcatggtca 1380
 tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga 1440
 agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg 1500
 cgctcactgc ccgctttcca gtccggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 1560
 caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt ggcgcgtctt ccgcttcctc gctcactgac 1620
 tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcgttatcag ctactcaaa ggcggtaata 1680
 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa 1740
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 1800
 gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 1860
 agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gacctgccg 1920
 cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca 1980
 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gtctgcctca agctgggctg tgtgcacgaa 2040
 cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg 2100
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 2160
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg 2220
 acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 2280
 tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgttg caagcagcag 2340
 attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 2400
 gtcagtggga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 2460
 ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 2520
 taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 2580
 ctatttcggt catccatagt tgcctgactc ccgctcgtgt agataactac gatacgggag 2640
 ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 2700
 gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 2760

ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 2820
 gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgtcgtcg 2880
 tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 2940
 atgttgtgca aaaaagcggc tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg 3000
 gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcc 3060
 tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 3120
 atggggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 3180
 agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 3240
 ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca 3300
 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 3360
 aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat 3420
 tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa 3480
 aataa caaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 3540
 accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc 3598

<210> 14

<211> 3590

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 pUC19 dar

<400> 14

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcaggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgog gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctoga 420
 gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgtttt gttttactat 480
 gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataaacacct 540

tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
 tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctt 660
 tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgtt 720
 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
 ttaaaaatat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
 atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacact cactaagttt tacacgatta 1080
 taatttcttc atagccagcg gatccgatat cgggccgct agcgtaacc ctgctttaat 1140
 gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
 taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccc gtttcggttc attctaata 1260
 atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
 gtccgtcgac gaattcgagc tcggcgcgcc aagcttgccg taatcatggt catagctgtt 1380
 tcctgtgtga aattgttata cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 1440
 gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact 1500
 gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 1560
 ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 1620
 ctcggtcggt cggtgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 1680
 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 1740
 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 1800
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 1860
 ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgc ctctctgtt ccgacctgc cgcttaccgg 1920
 atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgtgttag 1980
 gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 2040
 tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca 2100
 cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 2160
 cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 2220
 tggatatctg gctctgtga agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc 2280

cggcaaaacaa accaccgctg gtagcgggtgg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg 2340
 cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg 2400
 gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 2460
 gatcctttta aattaataat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 2520
 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg 2580
 ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg agggccttacc 2640
 atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagattttatc 2700
 agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 2760
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 2820
 tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgttttggtat 2880
 ggcttcattc agctccggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg 2940
 caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggcgcgagt 3000
 gttatcactc atgggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 3060
 atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 3120
 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 3180
 aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3240
 gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgt tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac 3300
 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat 3360
 aaggcgacga cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 3420
 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 3480
 aatagggggt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 3540
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccttttcgtc 3590

<210> 15

<211> 3584

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 pUC19 dar

<400> 15

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcātcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataaccgc atcaggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcmc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420
 gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
 gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540
 tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
 tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
 tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgtt 720
 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgccc tgtggaaagt 900
 ttaaaaatat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
 atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
 taattttctc atagccagca gatctgccgg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140
 gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
 taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccc gtttcgggtc attctaata 1260
 atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
 gtccgtcgac gagctcggcg cgccaagctt gccgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt 1380
 gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440
 agcctggggg gcctaagag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccc 1500
 tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 1560
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcgg 1620
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1800

aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt 1860
 tccccctgga agctccctcg tgcgtctctc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 2100
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtagt tagggcgtgc 2160
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
 aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 2400
 aaactcacgt taagggattt tggtcagag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 2520
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 2580
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 2760
 ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000
 actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180
 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240
 atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300
 cagcgtttct gggtagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360
 gacacggaaa tggtgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540

gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccttt cgtc

3584

<210> 16

<211> 4507

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 16

tcgcgcgctt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgcg agctcctcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgTTTT gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt ttatatattg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
ttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaattttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga tttaattggt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat ttgggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttag catgtagtct 1020
atataatgag gatTTTgcaa tactttcatt catacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctt atagccagcc caccgcggtg ggccggccgc tgcagtctag aaggcctcct 1140
gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata ttgctttca attctgttgt 1200
gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttcggttcat 1260
tctaatgaat atatcaccg ttactatcgt atttttatga ataatttct ccgttcaatt 1320

tactgattgt ccgtcgagca aatttacaca ttgccactaa acgtctaaac ccttgtaatt 1380
 tgtttttggt ttactatgtg tgttatgtat ttgatttgcg ataaattttt atatttggt 1440
 ctaaatttat aacacctttt atgctaacgt ttgccaacac ttagcaatth gcaagttgat 1500
 taattgattc taaattattt ttgtcttcta aatacatata ctaatcaact ggaaatgtaa 1560
 atatttgcta atatttctac tataggagaa ttaaagttag tgaatatggt accacaaggt 1620
 ttggagattt aattgttgca atgctgcatg gatggcatat acaccaaaaca ttcaataatt 1680
 cttgaggata ataatggtac cacacaagat ttgaggtgca tgaacgtcac gtggacaaaa 1740
 ggtttagtaa tttttcaaga caacaatggt accacacaca agttttgagg tgcattgcat 1800
 gatgccctgt ggaaagttha aaaatatttt ggaaatgatt tgcattggaag ccatgtgtaa 1860
 aaccatgaca tccacttgga ggatgcaata atgaagaaaa ctacaaatth acatgcaact 1920
 agttatgcat gtatgtctata taatgaggat tttgcaatac tttcattcat acacactcac 1980
 taagtthttac acgattataa tttcttcata gccagcggat ccgatatcgg gcccgctagc 2040
 gttaaccttg ctttaattgag atatgcgaga cgctatgat cgcatgatat ttgctttcaa 2100
 ttctgttggt cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgccggtt 2160
 tcggttcatt ctaatgaata tatcaccgt tactatcgta tttttatgaa taatattctc 2220
 cgttcaatth actgattgtc cgtcgacgaa ttcgagctcg gcgcgccaag cttggcgtaa 2280
 tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 2340
 cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta 2400
 attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa 2460
 tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgtt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctcgc 2520
 ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctggggcgag cggtatcagc tcaactaaag 2580
 gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 2640
 ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gcgcgcttgc tggcgthttt ccataggctc 2700
 cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 2760
 ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg 2820
 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 2880
 catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 2940
 gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag 3000
 tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 3060

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 3120
 actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 3180
 gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 3240
 aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 3300
 gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gagattatca 3360
 aaaaggatct tcacctagat ctttttaa ataaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 3420
 atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca 3480
 gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 3540
 atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 3600
 ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc 3660
 cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt 3720
 agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca 3780
 cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca 3840
 tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt agtccttcg gtctccgat cgttgtcaga 3900
 agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3960
 gtcattgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4020
 gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 4080
 ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4140
 tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 4200
 tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 4260
 gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact cttccttttt 4320
 caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4380
 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 4440
 gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccaggccc 4500
 tttcgtc 4507

<210> 17

<211> 5410

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 17

```

ttttggaaat gatttgcacg gaagccatgt gtaaaacacat gacatccact tggaggatgc 60
aataatgaag aaaactacaa atttaccatgc aactagttat gcatgtagtc tatataatga 120
ggattttgca atactttcat tcatacacac tcactaagtt ttacacgatt ataatttctt 180
catagccagc ggatccgata tcgggcccgc tagcggttaac cctgctttaa tgagatatgc 240
gagacgccta tgatcgcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacggt gtaaaaaacc 300
tgagcatgtg tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt catttcaatg aatatatcac 360
cgtttactat cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttggtttt gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgtt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgccc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat tttggaaatg atttgcacgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataataaga aaactacaaa ttaccatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taatttcttc atagccagca gatctgcggg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140
gagatatgag agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcgggtt atttcaatga 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
gtccgtcgac gagctcggcg cgccaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt 1380
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440
agcctggggg gcctaataag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 1500
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag 1560
aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgtc actgactcgc tgcgctcggg 1620

```

cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcacia 1800
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat accaggcggt 1860
 tccccctgga agctccctcg tgcgtctctc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
 cagttcgggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 2100
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 2160
 tacagagtgc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
 acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 2400
 aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 2520
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttggttcac 2580
 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 2760
 ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940
 agcgggttagc tccttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000
 actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120
 ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180
 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240
 atccagttcg atgtaaccca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300
 cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gagggccctt cgtctcgcgc gtttcgggtga 3600
 tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 3660
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg 3720
 ctggcttaac tatgcccgcac cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga 3780
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaaata ccgcacagcgc gccattcgc cattcaggct 3840
 gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggccctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 3900
 aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgccca gggttttccc agtcacgacg 3960
 ttgtaaaacg acggccagtg aattcggcgc gccgagctcc tcgagcaaat ttacacattg 4020
 ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt ttttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg 4080
 atttgcgata aatttttata tttggtacta aatttataac accttttatg ctaacgtttg 4140
 ccaacactta gcaatttgca agttgattaa ttgattctaa attatttttg tcttctaaat 4200
 acatatata atcaactgga aatgtaaata tttgctaata tttctactat aggagaatta 4260
 aagtgagtga atatggtacc acaaggtttg gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat 4320
 ggcatataca ccaaacattc aataattctt gaggataata atggtaccac acaagatttg 4380
 aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaaggc ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc 4440
 acacacaagt tttgaggtgc atgcatggat gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga 4500
 aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac catgacatcc acttgaggga tgcaataatg 4560
 aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt 4620
 gcaatacttt cattcataca cactcactaa gttttacacg attataattt cttcatagcc 4680
 agcccaccgc ggtgggcggc cgctgcagc ctagaaggcc tcctgcttta atgagatatg 4740
 cgagacgcct atgatcgcat gatatttgct ttcaattctg ttgtgcacgt tgtaaaaaac 4800
 ctgagcatgt gtagctcaga tccttaccgc cggtttcggg tcattctaat gaatatatca 4860
 cccgttacta tcgtattttt atgaataata ttctccgttc aatttactga ttgtccgtcg 4920
 agcaaattta cacattgcca cttaacgtct aaacccttgt aatttgtttt tgttttacta 4980
 tgtgtgttat gtatttgatt tgcgataaat ttttatattt ggtactaaat ttataacacc 5040
 ttttatgcta acgtttgcca acacttagca atttgcaagt tgattaattg attctaaatt 5100

atttttgtct tctaaatata tataactaatc aactggaaat gtaaataattt gctaataattt 5160
 ctactatagg agaattaaag tgagtgaata tgggtaccaca aggtttggag atttaattgt 5220
 tgcaatgctg catggatggc atatacacca aacattcaat aattcttgag gataataatg 5280
 gtaccacaca agatttgagg tgcatgaacg tcacgtggac aaaaggttta gtaatttttc 5340
 aagacaacaa tgttaccaca cacaagtttt gaggtgcatg catggatgcc ctgtggaaag 5400
 tttaaaaata 5410

<210> 18
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(648)

<220>
 <223>

<400> 18
 tgg tgg aaa aac aag cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac 48
 Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His
 1 5 10 15
 tgc tcc tcc gca gtc gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg 96
 Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met
 20 25 30
 ccc ctt ctc gcc tgg tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc 144
 Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu
 35 40 45
 caa gcc gac gga aag gat tgc ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac 192
 Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn
 50 55 60
 caa tcc tac ttt tac ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tgc tgg 240
 Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp
 65 70 75 80
 ttg aac gag tcc ttc aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tgc gag 288
 Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu
 85 90 95
 aac gct gct ctc gaa ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg 336
 Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu
 100 105 110
 gaa aag gct ggc atc ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tgc 384
 Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser
 115 120 125

tcc ggc ttt gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta 432
 Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu
 130 135 140

acc gcg acc gcg tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc 480
 Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu
 145 150 155 160

ggc cac aac ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc 528
 Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe
 165 170 175

tgg aag ctc caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt 576
 Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
 180 185 190

ttc ccc caa gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa 624
 Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
 195 200 205

gtc gac cac cac tta ttc ccc agc 648
 Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
 210 215

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 19

Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His
 1 5 10 15

Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met
 20 25 30

Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu
 35 40 45

Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn
 50 55 60

Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu
 85 90 95

Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu
 130 135 140

Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu
145 150 155 160

Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe
165 170 175

Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
180 185 190

Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
195 200 205

Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
210 215

<210> 20

<211> 12093

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 20

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgccca 120
tagtgggccc tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcgggccc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accgggcccga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgccggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctc gagcagggac tcgcggtgat tgctgatgga ttggcgaaaa 960

ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccg c tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcaactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa 1260
 ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgcttg ctggcgctttt tccataggct 1380
 ccgccccctt gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tgggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcac c aatggcgacc 2040
 tgggcccgtt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tgggtgatgc cagcatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgtccat caagaagagc 2280
 gaattcgcg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctggttg ccctcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
 cctcgcggaa aacttgccc tcaactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactacccc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtccct gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700

tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatattat 2880
 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
 tgcgccccct gccgcgaac ggccacccc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcagggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cgcccgctcg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggtt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
 tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgctg atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaacagc cagcgctggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcca taatcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440

tgggtttcaaa atcgggtccg tgcatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcacccgaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggtcttttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
 ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTgg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg gcacattgcc cggcggtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggTgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgc ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgtcgt ctgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccáag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttcttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180

ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgagggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactgggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatac accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctgggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgata gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
 aaccttcgcg ctcattgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctgggt gaacacgcct gggatcaatga 6840
 tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgagg cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgccctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgcgg gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatgggt gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcgggccga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920

acagttgttt ccttactggg ctttctcagc cccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 cggctttatc cagcgaatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgaa 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa 8940
 ggaaggggaag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattatt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggccca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660

agttcgggctg ggcgcgagccc ctgatgtctt tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gactacgtgc tcgtcgcgat cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccgcgcg attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgcgc acagctgcgc aaggaacgcc cgctcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctgcctcgc agttcattca gggcacccga caggctcggc 10020
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgcccc gtcatacgcc aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacgcggc ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcacatgc ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgccca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt 10680
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggcttcc tacgtgttcc gcttccctta gcagcccttg cgccctgagt gcttgccgca 10800
 gcgtgaagct tgcacgcctg caggctgcgc gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaacatgac atccacttgg aggatgcaat 11400

aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttggtc acgttgtaaa 11640
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgccggttt cggttcattc taatgaatat 11700
 atcaccggtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 gtcgacgaat tcgagctcgg cgcgcctcta gaggatcgat gaattcagat cggctgagtg 11820
 gctccttcaa cgttgcggtt ctgtcagttc caaacgtaaa acggcttggtc ccgcgtcatc 11880
 ggcgggggtc ataacgtgac tcccttaatt ctccgctcat gatcagattg tcgtttcccg 11940
 ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag gatatatggg cgggtaaacc taagagaaaa 12000
 gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aaggcggtga aaaggtttat ccttcgtcca 12060
 tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cca 12093

<210> 21

<211> 12085

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette.

<400> 21

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120
 tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt gggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660

ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
 gcgaggcgggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaaac agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcgggcgca 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgctc agacgcccg agcagccgc tacgggcttt ttcatgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaaa 1260
 ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgcttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgct ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc cttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata acctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccctctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttcgcacctg ggggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc gcccgcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca 1980
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcag tccgcgagct ggccgcac aatggcgacc 2040
 tgggccgcct gggcgccctg ctgaaactct ggctaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggctcat gatggcggtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtccca tgcgtccat caagaagagc 2280
 gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggtggttg cctcgcgc tggtgtggcg gccgtctatg gccctgaaa 2400

cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
 cctcgcggaa aacttggccc tcaactgacag atgagggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcaccg ggccggcggt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
 ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatattat 2880
 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaaccc tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
 tgcccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgttgcca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 ggggcctggg tggcggcctg cccttcactt cgcccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggtg ataggtaaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
 tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcagggtta tgccgetcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggcagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgtggc 4020
 gcgatttagc ccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140

cgtgttgagg ccaacgccc a taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggg gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt cgggcgggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440
 tggtttcaaa atcgggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
 ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gaggcccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcagg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc ggggtcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880

gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgtcgt ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgcgt ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggtatc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgtt ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcggcg gtatgctgct gggggcggtg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtgatg cgcatttca tctcgggcgc acttaatt 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcggggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgtct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcgga ctgcggcggt ggcgctggtg 7620

gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctcg cagcggggcct ggcgggggagc 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccggt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttccct tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc cccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtcc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgtgacg ccgtcccga ctgatgggt 8400
 gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgcaaa aaccgtctat caggcgcatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtogaagct 9360

agcttgggtc cgcctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagtct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctgggcgaac 9660
 agttcgggtg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccgcgcg attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aagggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctcgctcctg agttcattca gggcacccga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcacgatc ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gcccaactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt 10680
 ttccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggcttcc tacgtgttcc gttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcggca 10800
 gcgtgaagct tgcatgcctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100

attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataagagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat 11520
 agccagcgga tccgatatcg ggcccgttag cgttaaccct gctttaatga gatatgcgag 11580
 acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggg ttcggttcat tctaataat atatcacccg 11700
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 attcgagctc ggcgcgcctc tagaggatcg atgaattcag atcggctgag tggctccttc 11820
 aacgttgccg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tcggcggggg 11880
 tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat tgctgtttcc cgccttcagt 11940
 ttaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa cctaagagaa aagagcgttt 12000
 attagaataa tcggatatatt aaaagggcgt gaaaagggtt atccttcgct catttgatg 12060
 tgcatgccaa ccacagggtt cccca 12085

<210> 22

<211> 12079

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 22

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120
 tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggccgg cagcaccggc 180
 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420

gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggtt ggggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccc cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
 ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
 gcgaggcggg tttttcggcc ggggacggcg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcgggcgga 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggggcgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgctc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctt ctggcgcttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc 1500
 gaccctgcc cttaccgat acctgtccgc ctttctcct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccattctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttg tgatatcaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgca ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 aatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
 tggggcgctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc cagcatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160

gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctgggtg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
 cctcgcgga aacttggccc tcaactgacag atgagggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgagg ggcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgagggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggtgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 aaaccttggt ttaaccagg gctgcgcct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccct tctcgaacc tccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000
 tgcccccct gccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatgg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg ccttcactt cggcgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggt gccgtgctcg 3300
 tgctcgggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga ctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact 3600
 tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat ttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccagggt 3780
 gctgcctcag attcagggtta tgccgtcaa ttcgctgctg atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900

cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgctc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatagc gtaaacagc cagcgtctgc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcggc catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt cgggcgggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440
 tggtttcaaa atcgggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctgtt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctctgct aaggtatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttocaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtggag ccgatggcgt ctttgctcgc 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggtcttttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt tccccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
 ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640

ggcaccaggc ggggtcaaadc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcggggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgggccg ccgtggagcg 5940
 ttgcgctcgt ctgcaacagg agggggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120
 ttctttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtggg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cggtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcttaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gggggcggtg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380

cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tccctggcgc acttaatat 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcggggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgtct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggggc 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccg gctctgtctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccgggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gtttcctcag 8100
 cggttttacc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgag 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttca cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaat atcctgtttg atgggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgcaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaacatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcgggtgc ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagt 9120

aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaactct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctcgtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcgggc 10380
tgagtggctc cttcaacggt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgcg 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcctgac ttgatccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgttgcggtt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttcttcta gcagcccttg cgccctgagt gcttgccgca 10800
gcgtgaagct tgcattgctg caggtcgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860

attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tataatttgg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggtg ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagcaga tctgccggca tcgatcccg gccatggcct gctttaatga gatatgcgag 11580
 acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttcggttcat tctaataaat atatcacccg 11700
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 gctcggcgcg cctctagagg atcgatgaat tcagatcggc tgagtggctc cttcaacggt 11820
 gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc gtcacggcg ggggtcataa 11880
 cgtgactccc ttaattctcc gtcatgac agattgtcgt ttcccgctt cagtttaaac 11940
 tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg taaacctaa agaaaagagc gtttattaga 12000
 ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatcctt cgtccatttg tatgtgcatg 12060
 ccaaccacag ggttccca 12079

<210> 23

<211> 13002

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit zwei
Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 23

gacatggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gccgaaacg atccgacagc 60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120

tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggccggg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggegctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
 ccggcacgcg accgggagca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720
 gcgaggcggg tttttcggcc ggggacggc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgctc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagagggtgc gaaaccgcac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgttaga ctttcttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgcccg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaccaag ccaaccagga 1860

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 aaatcacggg cgctcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcac aatggcgacc 2040
 tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcggt gattgccaaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgcgg agctgggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctgggtg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgcgctcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
 cctcgcggaa aacttggccc tcaactgacag atgagggggc gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc ggcgcgcggt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgccgtatgt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgagg gcgcgactac 2700
 tgacagatga gggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccctc tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000
 tgccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatgg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcagggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg ccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga ctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600

tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccacgct cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
 tggtttcaa atcggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccgga ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340

ctatatttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgtttttg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc ggggtcaaac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttgcgctcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc 6180
 ccgtctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggccccgacg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggttca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcggggtc cgtttacgag 7140
 cagcaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gcgggcggtt ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tctcgggcgc acttaatt 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg 7500
 acggtagggc ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgccgtct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgaa ctgcggggcg ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctg cagcgggcct ggcggggcg 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttctcag 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgctg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg 8820

tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
 ccctaaaggg agcccccgat ttagagcttg acggggaaag cgggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg atttatatcag ctgggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtcca tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgga cttcgccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcaa gtcctcatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatgtgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcctgatc ttgatocct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga 10800
 gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgcgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata attttctcat 11520
 agccagccca ccgcggtggg cgccgcctg cagtctagaa ggctcctgc tttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcggttt cggttcattc taatgaatat 11700
 atcaccggtt actatcgat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 gtcgagcaaa tttacacatt gccactaac gtctaaacc ttgtaatttg tttttgtttt 11820
 actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggtact aaatttataa 11880
 caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940
 aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaaat atttgctaata 12000
 atttctacta taggagaatt aaagtgagtg aatatggtac cacaagggtt ggagatttaa 12060
 ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120
 aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180
 tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgaggtg catgcatgga tgccctgtgg 12240
 aaagtttaaa aatatttttg aatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300

cacttggagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt 12360
 agtctatata atgaggattt tgcaatactt tcattcatac acactcacta agttttacac 12420
 gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct 12480
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttggtgca 12540
 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgccggttcc ggttcattct 12600
 aatgaatata tcacccgtta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660
 tgattgtccg tcgacgaatt cgagctcggc ggcctctag aggatcgatg aattcagatc 12720
 ggctgagtgg ctcttcaac gttgcggttc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttggtcc 12780
 cgcgctcatcg gcgggggtca taacgtgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt 12840
 cgtttccgcg cttcagttta aactatcagt gtttgacagg atatattggc gggtaaacct 12900
 aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg gatatttaaa agggcgtgaa aagggtttatc 12960
 ctctgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc ca 13002

<210> 24

<211> 13905

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit drei
Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 24

gatctggcgc cgccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca cagggtgcga ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgccca 120
 tagtgggcgg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcacgggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
 ttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgtgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcatccatg 660
 ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720

gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgcgc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgccggcgca 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc .ttcgacgaag 900
 ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggac tcgcggtgat tgatgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtaggaac gttgaaggac cgagaaagg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgcgtc agacgcccg agcagccgc tacgggcttt ttcattgcct gccttagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccgcttc tggcgctctt ccgcttctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgcttc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgcttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc 1500
 gaccctgccg ctaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgttaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggttaca 1980
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcacg aatggcgacc 2040
 tgggccgcct gggcgccctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggatcat gatggcgctg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cagtcacca tgccgtccat caagaagagc 2280
 gacttcggcg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctggttg ccctgcgcgc tgggtggcg gccgtctatg gcctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460

cctcgcggaa aacttggccc tctactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcaccg ggccgcccgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 aaaccttggt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
 tgcccccctc ggccgcgaac ggcctcaccg caaaaatggc agcgttgcca gtccttgcca 3060
 ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgaggggc 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgggggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
 tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatgtt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcagggtt tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcatata gcggccagcc atccgtcacc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatagc gtaaacagc cagcgtggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccg catccaacgc cattcatggc 4200

catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggtcttttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcgag 5340
 ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatatta 5400
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gaggcccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgcgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggtaaatac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggatgaatg atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggccg ccgtggagcg 5940

ttgcgctcgt ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttccttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcggtgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgcgtgc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccgcgag atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctt gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgcgc gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tctcggcgc acttaatt 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcattc ctgccgtct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcgaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg 7680

gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccg gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcgccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttctcag 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac gccttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggag aaagcgaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcgggtcg ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaaccca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420

tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat caggggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaaac 9660
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tacttttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgtc gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gtcctcatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatgtgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcgggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcacatgac ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggctttc tacgtgttcc gtttcttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga 10800
 gcgtgaagct tgcatgcctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 attgccaacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgtgcat 11160

ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatatatt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat 11520
 agccagccca ccgcggtggg cgcccgctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcctatgac gcgatgatt tgctttcaat tctgttggtc acgttgtaaa 11640
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgccggtt cggttcattc taatgaatat 11700
 atcaccggtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 gtcgagcaaa ttacacatt gccactaaac gtctaaacc ttgtaatttg tttttgtttt 11820
 actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggtagt aaatttataa 11880
 caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940
 aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaaat atttgcta 12000
 atttctacta taggagaatt aaagtgagtg aatatggtac cacaaggttt ggagatttaa 12060
 ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120
 aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180
 tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgaggtg catgcatgga tgccctgtgg 12240
 aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300
 cacttgagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt 12360
 agtctatata atgaggattt tgcaatactt tcattcatac acactcacta agttttacac 12420
 gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct 12480
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttggtgca 12540
 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgccggttgc ggttcattct 12600
 aatgaatata tcaccggtta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660
 tgattgtccg tcgagcaaat ttacacattg ccaactaaac tctaaaccct tgtaatttgt 12720
 ttttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg atttgcgata aatttttata tttggtacta 12780
 aatttataac accttttatg ctaacgtttg ccaactacta gcaatttgca agttgattaa 12840
 ttgattctaa attatttttg tcttctaaat acatatact atcaactgga aatgtaata 12900

tttgctaata tttctactat aggagaatta aagtgagtga atatggtacc acaagggttg 12960
 gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat ggcatataca ccaaaccattc aataattctt 13020
 gaggataata atggtaccac acaagatttg aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaagg 13080
 ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc acacacaagt tttgaggtgc atgcatggat 13140
 gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac 13200
 catgacatcc acttgaggga tgcaataatg aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt 13260
 tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt gcaatacttt cattcataca oactcactaa 13320
 gttttacacg attataattt cttcatagcc agcagatctg ccggcatcga tcccgggcca 13380
 tggcctgctt taatgagata tgcgagacgc ctatgatcgc atgatatttg ctttcaattc 13440
 tgttgtgcac gttgtaaaaa acctgagcat gtgtagctca gatccttacc gccgggttcg 13500
 gttcattcta atgaatatat caccggttac tatcgtattt ttatgaataa tattctccgt 13560
 tcaatttact gattgtccgt cgacgagctc ggcgcgcctc tagaggatcg atgaattcag 13620
 atcggtgag tggctccttc aacgttgccg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg 13680
 tcccgcgtca tcggcggggg tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat 13740
 tgtcgtttcc cgccttcagt ttaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa 13800
 cctaagagaa aagagcggtt attagaataa tcggatattt aaaagggcgt gaaaagggtt 13860
 atccttcgtc catttgtatg tgcatgccaa ccacagggtt cccca 13905

<210> 25

<211> 15430

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanz. Expressionsvektor mit zwei Promotor-Terminator-Expressionskassetten inseriert ist
 Physcomitrella patens Elongase und Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<400> 25

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120

tagtgggcccg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggccccg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttggggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttotttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
 ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
 gcgaggccgg ttttccggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgcca 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 ccgggtccgga cgcagcgctc gagcaggagc tcgcggtgat tgctgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgcgtc agacgcccg agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggcctc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaaccgcgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccattctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgttaga ctttcttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcac aatggcgacc 2040
 tggggcgccct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc cacgacctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggtcat gatgggctg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
 cctcgcgga aacttggccc tcaactgacag atgagggggc gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc ggcgcgcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt ggggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatatat 2880
 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga cgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccctt tctogaacct tcccggcccg ctaacggggg cctcccatcc ccccaggggc 3000
 tgccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060
 ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcggggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600

tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggctctttc actccatcga catatcggt tgcctcata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggcgg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtgggtat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340

ctatTTTTtg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatTTta 5400
 ctggatgaat tgTTTTagta cctagatgtg ggcgaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgaacttc ttccgcatca agtgTTTTgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 gggaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggTgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggTccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgTcgt ctggaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaTaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggTcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttcttTgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180
 ccgtctgcc ctgttcacca cgcgaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggTgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttTctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgTcgccgac 6660
 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggTcaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggTca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcggggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtt gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgcgc gtatgctgct gcgggcggtt ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tctcggcgc acttaataatt 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcggcg 7500
 acggtaggag ctgtgcagcc gctgatgggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggctt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggag 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcgccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttctt tgggtccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgag 8520
 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgatg gccactacg 8820

tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaaggggaag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattttt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctcgcaa 9420
 tcggggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtoga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgtgc ctcgtcctgc agttcattca gggcacccga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccggggc cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca	10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt	10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg	10740
actggctttc tacgtgttcc gtttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgoggca	10800
gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgccgag ctctctgagc aaattttacac	10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta	10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggt actaaattta taacaccttt tatgctaacg	10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct	11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga	11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat	11160
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt	11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt	11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat	11400
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga	11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat	11520
agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag	11572
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu	
1 5 10	
ttg gat ggg aag gtc tgc cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt	11620
Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe	
15 20 25	
ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctg gtt	11668
Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val	
30 35 40	
gac agt ccc aca ccc atc gtc ctg ggt gtt tct gta tac ttg act att	11716
Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile	
45 50 55	
gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc	11764
Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg	
60 65 70	
gcc tgc gag cca ttt ttg ctg caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg	11812
Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu	
75 80 85 90	
ttc tgt ttt ggc ctg agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag	11860

Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln	
95 100 105	
gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa	11908
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys	
110 115 120	
cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac	11956
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr	
125 130 135	
gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg	12004
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg	
140 145 150	
caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att	12052
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile	
155 160 165 170	
tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct	12100
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser	
175 180 185	
gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc	12148
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe	
190 195 200	
ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt	12196
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu	
205 210 215	
ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg	12244
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu	
220 225 230	
aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca	12292
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro	
235 240 245 250	
caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt	12340
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe	
255 260 265	
ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga	12388
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly	
270 275 280	
aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgcttt	12435
Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu	
285 290	
aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg	12495
ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa	12555
tgaatataac acccggttact atcgtatttt tatgaataat attctccggt caatttactg	12615
attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt	12675

ttgttttact	atgtgtgttta	tgtattttgat	ttgcgataaa	tttttatatt	tggtactaaa	12735
tttataacac	cttttatgct	aacgtttgcc	aacacttagc	aatttgcaag	ttgattaatt	12795
gattctaaat	tatTTTTgtc	ttctaaatac	atatacta	aatcaactgg	tgtaaataatt	12855
tgctaataatt	tctactatag	gagaattaaa	gtgagtgaat	atgggtaccac	aagggtttgga	12915
gatttaattg	ttgcaatgct	gcatggatgg	catatacacc	aaacattcaa	taattcttga	12975
ggataataat	ggtaccacac	aagatttgag	gtgcatgaac	gtcacgtgga	caaaagggttt	13035
agtaattttt	caagacaaca	atgttaccac	acacaagttt	tgagggtgcat	gcatggatgc	13095
cctgtggaaa	gtttaaaaat	atTTTggaaa	tgatttgc	ggaagccatg	tgtaaaacca	13155
tgacatccac	ttggaggatg	caataatgaa	gaaaactaca	aattttacatg	caactagtta	13215
tgcatgtagt	ctatataatg	aggattttgc	aatactttca	ttcatacaca	ctcactaagt	13275
tttacacgat	tataattttct	tcatagccag	cggatcc	atg gta ttc gcg ggc ggt		13330
				Met Val Phe Ala Gly Gly		
				295		
gga ctt cag	cag ggc tct ctc	gaa gaa aac	atc gac gtc	gag cac att		13378
Gly Leu Gln	Gln Gly Ser Leu	Glu Glu Asn	Ile Asp Val	Glu His Ile		
	300	305	310			
gcc agt atg	tct ctc ttc agc	gac ttc ttc	agt tat gtg	tct tca act		13426
Ala Ser Met	Ser Leu Phe Ser	Asp Phe Phe	Ser Tyr Val	Ser Ser Thr		
	315	320	325			
gtt ggt tcg	tgg agc gta cac	agt ata caa	cct ttg aag	cgc ctg acg		13474
Val Gly Ser	Trp Ser Val His	Ser Ile Gln	Pro Leu Lys	Arg Leu Thr		
330	335	340	345			
agt aag aag	cgt gtt tcg gaa	agc gct gcc	gtg caa tgt	ata tca gct		13522
Ser Lys Lys	Arg Val Ser Glu	Ser Ala Ala	Val Gln Cys	Ile Ser Ala		
	350	355	360			
gaa gtt cag	aga aat tcg agt	acc cag gga	act gcg gag	gca ctc gca		13570
Glu Val Gln	Arg Asn Ser Ser	Thr Gln Gly	Thr Ala Glu	Ala Leu Ala		
	365	370	375			
gaa tca gtc	gtg aag ccc acg	aga cga agg	tca tct cag	tggt aag aag		13618
Glu Ser Val	Val Lys Pro Thr	Arg Arg Arg	Ser Ser Gln	Trp Lys Lys		
	380	385	390			
tcg aca cac	ccc cta tca gaa	gta gca gta	cac aac aag	cca agc gat		13666
Ser Thr His	Pro Leu Ser Glu	Val Ala Val	His Asn Lys	Pro Ser Asp		
	395	400	405			
tcg tgg att	gtt gta aaa aac	aag gtg tat	gat gtt tcc	aat ttt gcg		13714
Cys Trp Ile	Val Val Lys Asn	Lys Val Tyr	Asp Val Ser	Asn Phe Ala		
410	415	420	425			
gac gag cat	ccc gga gga tca	gtt att agt	act tat ttt	gga cga gac		13762

Asp	Glu	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Asp	
				430					435					440		
ggc	aca	gat	gtt	ttc	tct	agt	ttt	cat	gca	gct	tct	aca	tgg	aaa	att	13810
Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Trp	Lys	Ile	
			445					450					455			
ctt	caa	gac	ttt	tac	att	ggt	gac	gtg	gag	agg	gtg	gag	ccg	act	cca	13858
Leu	Gln	Asp	Phe	Tyr	Ile	Gly	Asp	Val	Glu	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Pro	
		460					465					470				
gag	ctg	ctg	aaa	gat	ttc	cga	gaa	atg	aga	gct	ctt	ttc	ctg	agg	gag	13906
Glu	Leu	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Glu	Met	Arg	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Glu	
	475					480					485					
caa	ctt	ttc	aaa	agt	tgc	aaa	ttg	tac	tat	gtt	atg	aag	ctg	ctc	acg	13954
Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Val	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	
490					495					500					505	
aat	gtt	gct	att	ttt	gct	gcg	agc	att	gca	ata	ata	tgt	tgg	agc	aag	14002
Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ile	Ile	Cys	Trp	Ser	Lys	
				510					515					520		
act	att	tca	gcg	gtt	ttg	gct	tca	gct	tgt	atg	atg	gct	ctg	tgt	ttc	14050
Thr	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Phe	
			525					530					535			
caa	cag	tgc	gga	tgg	cta	tcc	cat	gat	ttt	ctc	cac	aat	cag	gtg	ttt	14098
Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ser	His	Asp	Phe	Leu	His	Asn	Gln	Val	Phe	
		540					545					550				
gag	aca	cgc	tgg	ctt	aat	gaa	gtt	gtc	ggg	tat	gtg	atc	ggc	aac	gcc	14146
Glu	Thr	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Val	Val	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Asn	Ala	
	555					560					565					
gtt	ctg	ggg	ttt	agt	aca	ggg	tgg	tgg	aag	gag	aag	cat	aac	ctt	cat	14194
Val	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Trp	Lys	Glu	Lys	His	Asn	Leu	His	
570					575					580				585		
cat	gct	gct	cca	aat	gaa	tgc	gat	cag	act	tac	caa	cca	att	gat	gaa	14242
His	Ala	Ala	Pro	Asn	Glu	Cys	Asp	Gln	Thr	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Glu	
				590					595					600		
gat	att	gat	act	ctc	ccc	ctc	att	gcc	tgg	agc	aag	gac	ata	ctg	gcc	14290
Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Trp	Ser	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala	
			605					610					615			
aca	gtt	gag	aat	aag	aca	ttc	ttg	cga	atc	ctc	caa	tac	cag	cat	ctg	14338
Thr	Val	Glu	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gln	His	Leu	
		620					625					630				
ttc	ttc	atg	ggt	ctg	tta	ttt	ttc	gcc	cgt	ggt	agt	tgg	ctc	ttt	tgg	14386
Phe	Phe	Met	Gly	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Arg	Gly	Ser	Trp	Leu	Phe	Trp	
		635				640					645					
agc	tgg	aga	tat	acc	tct	aca	gca	gtg	ctc	tca	cct	gtc	gac	agg	ttg	14434
Ser	Trp	Arg	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Arg	Leu	
650					655					660				665		

ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca	14482
Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr	
670 675 680	
gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg	14530
Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val	
685 690 695	
act gag ctg atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc	14578
Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser	
700 705 710	
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca	14626
His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala	
715 720 725	
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg	14674
Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp	
730 735 740 745	
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca	14722
Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr	
750 755 760	
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc	14770
Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe	
765 770 775	
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc	14818
Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly	
780 785 790	
act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca	14866
Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala	
795 800 805	
gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtaa accctgcttt aatgagatat	14920
Glu Gln His Ala Thr Thr Ser	
810 815	
gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa	14980
cctgagcatg ttagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc	15040
accggttact atcgtatttt tatgaataat attctccggt caatttactg attgtccgtc	15100
gacgaattcg agctcggcgc gcctctagag gatcgatgaa ttcagatcgg ctgagtggct	15160
ccttcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc	15220
gggggtcata acgtgactcc ctttaattctc cgctcatgat cagattgtcg tttccgcct	15280
tcagtttaaa ctatcagtgt ttgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag	15340
cgtttattag aataatcgga tatttaaaag ggcgtaaaaa gggtttatcct tcgtccattt	15400
gtatgtgcat gccaaaccaca gggttcccca	15430

<210> 26

<211> 290

<212> PRT

<213> Unknown

<400> 26

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

Thr Glu
 290

<210> 27
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 27
 Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
 165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
 225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
 245 250 255
 Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
 260 265 270
 Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
 275 280 285
 Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
 290 295 300
 Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
 325 330 335
 Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
 340 345 350
 Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
 355 360 365
 Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
 370 375 380
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
 405 410 415
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
 420 425 430
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 450 455 460
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
 485 490 495
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
 500 505 510
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 515 520 525

<210> 28

<211> 17752

<212> DNA
 <213> Unknown

<220>

<223> pflanz. Expressionsvektor mit 3
 Promotor-Terminator- Expressionskassetten
 inseriert mit Physcomitrella Elongase + Desaturase
 + Phaeodactylum Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<220>

<221> CDS

<222> (15791)..(17200)

<400> 28

```

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120
tagtgggccc tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttggggt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgagc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accggggcga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcgcgcgca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggggac tcgcggtgat tgctgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080

```

ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcgcccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaaa 1260
 ggcggttaata cgggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
 ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 1440
 aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc ctctgtgcgt ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata acctgtcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcggtgt tccttcttca 1740
 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttcagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctget ggccgtcggc cagggtaca 1980
 aaatcacggg cgctgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcgcatc aatggcgacc 2040
 tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 tcggtgatgc caccatcctc gccctgctgg cgaagatga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cagctcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 gacgctcacc gggctggttg ccctgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agcgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
 cctcgcgaa aacttgccc tcaactgacag atgagggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc ggcgcgcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820

ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
 tgcccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggtt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cetttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
 tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 gctgcctcag attcaggtta tgccgctcaa ttcgctcgtt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt gcccatagt cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 cgtgttgagg ccaacgccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtg ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
 tggtttcaaa atcgggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560

cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtggagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
 ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatatta 5400
 ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgttttg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggat tcgtgcagg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcac tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggtaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 cgacgcgggg ttttcgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttcagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggccg ccgtggagcg 5940
 ttgcgctcgt ctggaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 ttcttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgccccg 6300

cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 cgagccgata accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgata gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccagcgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggccaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgtt ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gtcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgagg cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgtt gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgcgg gtatgctgct gcgggcgtt cggcggggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatt 7440
 tcgtattctt ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgtct gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt 7800
 tttgatccgc caatccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgc actcgaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg ggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040

aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gtttcctcag 8100
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatcogtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggtct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcttggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaaggggaag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 gatcgggtcg ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagt 9120
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattttt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgctgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctcgaa 9420
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccattcgcc gccaaactct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780

gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gtcctcatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataaccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacggt gccgttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatgac ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctcttg cgcttgcgtt 10680
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgagg 10740
 actggcttct tacgtgttcc gcttcttcta gcagcccttg cgccctgagt gcttgaggca 10800
 gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgcgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 attgccacta aacgtctaaa ccttgtaat ttgttttgt ttactatgt gtgttatgta 10920
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 tttgccaaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatatatt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat 11520

agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag 11572
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu
1 5 10

ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt 11620
Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe
15 20 25

ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt 11668
Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val
30 35 40

gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att 11716
Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile
45 50 55

gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc 11764
Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg
60 65 70

gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg 11812
Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu
75 80 85 90

ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag 11860
Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln
95 100 105

gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa 11908
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys
110 115 120

cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac 11956
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr
125 130 135

gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg 12004
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg
140 145 150

caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att 12052
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile
155 160 165 170

tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct 12100
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser
175 180 185

gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc 12148
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe
190 195 200

ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt 12196
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu
205 210 215

ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg 12244
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu

220	225	230	
aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca			12292
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro			
235	240	245	250
caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt			12340
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe			
255	260		265
ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga			12388
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly			
270	275		280
aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgcttt			12435
Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu			
285	290		
aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg			12495
ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa			12555
tgaatatatc acccgttact atcgatattt tatgaataat attctcgtt caatttactg			12615
attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt			12675
ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tggactaaa			12735
tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt			12795
gattctaaat tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt			12855
tgctaataatt tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttgga			12915
gatttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga			12975
ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaaggttt			13035
agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc			13095
cctgtggaaa gtttaaaaat attttgaaa tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca			13155
tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta			13215
tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt			13275
tttacacgat tataatttct tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt			13330
		Met Val Phe Ala Gly Gly	
		295	
gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att			13378
Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile			
300	305		310
gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act			13426
Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr			
315	320		325

gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg	13474
Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr	
330 335 340 345	
agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct	13522
Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala	
350 355 360	
gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca	13570
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala	
365 370 375	
gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag	13618
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys	
380 385 390	
tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat	13666
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp	
395 400 405	
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg	13714
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala	
410 415 420 425	
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac	13762
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp	
430 435 440	
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att	13810
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile	
445 450 455	
dtc caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca	13858
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro	
460 465 470	
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag	13906
Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu	
475 480 485	
caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg	13954
Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr	
490 495 500 505	
aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag	14002
Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys	
510 515 520	
act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc	14050
Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe	
525 530 535	
caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt	14098
Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe	
540 545 550	
gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc	14146
Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala	

555	560	565	
gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat			14194
Val Leu Gly Phe Ser	Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His		
570	575	580	585
cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa			14242
His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu			
	590	595	600
gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc			14290
Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala			
	605	610	615
aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg			14338
Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu			
	620	625	630
ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg			14386
Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp			
	635	640	645
agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg			14434
Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu			
	650	655	660
ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca			14482
Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr			
	670	675	680
gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg			14530
Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val			
	685	690	695
act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc			14578
Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser			
	700	705	710
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tgc tct aaa gaa ttc gtg agt gca			14626
His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala			
	715	720	725
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg			14674
Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp			
	730	735	740
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca			14722
Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr			
	750	755	760
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc			14770
Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe			
	765	770	775
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc			14818
Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly			
	780	785	790

act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca 14866
 Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala
 795 800 805

gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgta accctgcttt aatgagatat 14920
 Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 810 815

gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa 14980
 cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc 15040
 acccgttact atcgtatttt tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc 15100
 gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt ttgttttact 15160
 atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa tttataacac 15220
 cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt gattctaaat 15280
 tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt tgctaataatt 15340
 tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttggg gatttaattg 15400
 ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat 15460
 ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt agtaattttt 15520
 caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc cctgtggaaa 15580
 gtttaaaaaat attttggaaa tgatttgcac ggaagccatg tgtaaaacca tgacatccac 15640
 ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta tgcatttagt 15700
 ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt tttacacgat 15760
 tataatttct tcatagccag cagatctaaa atg gct ccg gat gcg gat aag ctt 15814
 Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu
 820 825

cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg aag cac aat gct gct acc ata 15862
 Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile
 830 835 840

tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa 15910
 Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu
 845 850 855

gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac ctc caa tca ttc gat cat ccc 15958
 Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro
 860 865 870

ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt ggc aac gat gtc act gta cag 16006
 Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln
 875 880 885

tac aag atg att cac ccg tac cat acc gag aag cat ttg gaa aag atg 16054
 Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met

890	895	900	905	
aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat				16102
Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp				
910		915	920	
acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga gaa gtc ttc aag att gtg cga				16150
Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg				
925		930	935	
cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc				16198
Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys				
940		945	950	
tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag tac cat tgg gtc acc acg gga				16246
Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly				
955		960	965	
acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac gga atc tcc caa gcg atg att				16294
Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile				
970		975	980	985
ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt				16342
Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg				
990		995	1000	
ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt				16390
Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly				
1005		1010	1015	
tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac tgg acc cac cac gct tac acc				16438
Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr				
1020		1025	1030	
aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc				16486
Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu				
1035		1040	1045	
cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat ccc gct cgt acc tgg cta cat				16534
Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His				
1050		1055	1060	1065
cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg				16582
Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu				
1070		1075	1080	
tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca				16630
Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala				
1085		1090	1095	
ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac gct ttc att cac tcg cga cgc				16678
Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg				
1100		1105	1110	
aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg tac att gcg gtg aac gtg att				16726
Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile				
1115		1120	1125	

gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc ctc gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt 16774
 Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe
 1130 1135 1140 1145

gga aac atc atg ctc atg ggt gtg gcg gaa tgc ctc gcg ctg gcg gtc 16822
 Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val
 1150 1155 1160

ctg ttt tgc ttg tgc cac aat ttc gaa tcc gcg gat cgc gat ccg acc 16870
 Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr
 1165 1170 1175

gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca gtc gac tgg ttc aag aca cag 16918
 Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln
 1180 1185 1190

gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg 16966
 Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr
 1195 1200 1205

gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac cac ttg ttc cca cgc atg agc 17014
 Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser
 1210 1215 1220 1225

agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc aag gtc cgc gaa att tgc gcc 17062
 Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala
 1230 1235 1240

aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac ccg tgg atc cac caa aac ttt 17110
 Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe
 1245 1250 1255

ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg gcc ggg acc ggt gcc aac tgg 17158
 Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp
 1260 1265 1270

cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg acc gga cgg gcg taa 17200
 Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu Thr Gly Arg Ala
 1275 1280 1285

agatctgccg gcacgatcc cgggccatgg cctgctttaa tgagatatgc gagacgccta 17260

tgatcgcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacggt gtaaaaaacc tgagcatgtg 17320

tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt cattctaattg aatatatcac ccgttactat 17380

cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga cgagctcggc 17440

gcgcctctag aggatcgatg aattcagatc ggctgagtggt ctccttcaac gttgcgggttc 17500

tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgctc cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact 17560

ccettaattc tccgctcatg atcagattgt cgtttccgcg cttcagttta aactatcagt 17620

gtttgacagg atatattggc gggtaaacct aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg 17680

gatatttaaa agggcgtgaa aaggtttatc cttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca 17740

cagggttccc ca

17752

<210> 29

<211> 290

<212> PRT

<213> Unknown

<400> 29

Met	Glu	Val	Val	Glu	Arg	Phe	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	Val	Ser
1				5					10					15	

Gln	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp
			20					25					30		

Thr	Pro	Thr	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Ser	Pro	Thr	Pro	Ile
		35					40					45			

Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu
	50					55					60				

Trp	Ile	Lys	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Ser	Glu	Pro	Phe	Leu
65					70					75					80

Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Val	His	Asn	Leu	Phe	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser
				85					90						95

Leu	Tyr	Met	Cys	Val	Gly	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr
			100					105					110		

Ser	Leu	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Ala	Ile
		115					120					125			

Leu	Val	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Met	Asp	Thr
	130					135					140				

Val	Ile	Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Phe	Leu	His
145					150					155					160

Val	Tyr	His	His	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Trp	Ala	Ile	Ala	His
				165					170						175

His	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Trp	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly
			180					185					190		

Val	His	Val	Leu	Met	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg
		195					200					205			

Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu
	210					215						220			

Thr	Gln	Phe	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Asn	Leu	Val	Gln	Ala	Tyr
225					230					235					240

Tyr	Asp	Met	Lys	Thr	Asn	Ala	Pro	Tyr	Pro	Gln	Trp	Leu	Ile	Lys	Ile
				245					250					255	

Leu	Phe	Tyr	Tyr	Met	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

260	265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys		
275	280	285
Thr Glu		
290		
<210> 30		
<211> 525		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<400> 30		
Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn		
1	5	10
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe		
20	25	30
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln		
35	40	45
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala		
50	55	60
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly		
65	70	75
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg		
85	90	95
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val		
100	105	110
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr		
115	120	125
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser		
130	135	140
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala		
145	150	155
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu		
165	170	175
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg		
180	185	190
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr		
195	200	205
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala		
210	215	220
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys		

225		230		235		240
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe						
		245		250		255
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly						
		260		265		270
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys						
		275		280		285
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr						
		290		295		300
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp						
		305		310		315
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile						
		325		330		335
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg						
		340		345		350
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu						
		355		360		365
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr						
		370		375		380
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro						
		385		390		395
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly						
		405		410		415
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser						
		420		425		430
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly						
		435		440		445
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu						
		450		455		460
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala						
		465		470		475
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp						
		485		490		495
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu						
		500		505		510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser						
		515		520		525

<211> 469
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 31

Met	Ala	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Val	1	5	10	15
Ala	Lys	His	Asn	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	Gln	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Ile	Tyr	35	40	45	
Asp	Leu	Gln	Ser	Phe	Asp	His	Pro	Gly	Gly	Glu	Thr	Ile	Lys	Met	Phe	50	55	60	
Gly	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Val	Gln	Tyr	Lys	Met	Ile	His	Pro	Tyr	His	65	70	75	80
Thr	Glu	Lys	His	Leu	Glu	Lys	Met	Lys	Arg	Val	Gly	Lys	Val	Thr	Asp	85	90	95	
Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys	100	105	110	
Arg	Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	115	120	125	
Gly	Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu	130	135	140	
Gln	Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	145	150	155	160
Tyr	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala	165	170	175	
Asn	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	180	185	190	
Leu	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln	195	200	205	
His	Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp	210	215	220	
Ser	Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp	225	230	235	240
His	Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met	245	250	255	
Pro	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile	260	265	270	
Leu	Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp	275	280	285	

Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala
 290 295 300

Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly
 305 310 315 320

Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val
 325 330 335

Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe
 340 345 350

Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu
 355 360 365

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
 370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
 405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
 465

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polylinker

<400> 32

gaattcggcg cgccgagctc ctcgag

26

<210> 33

<211> 265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polylinker-Terminator-Polylinker

<400> 33
 ccaccgcggt gggcgccgc ctgcagtcta gaaggcctcc tgctttaatg agatatgcga 60
 gacgcctatg atcgcgatg atttgctttc aattctgttg tgcacgttgt aaaaaacctg 120
 agcatgtgta gctcagatcc ttaccgcggg tttcggttca ttctaataa tatatcacc 180
 gttactatcg tatttttatg aataatatc tccgttcaat ttactgattg tccgtcgacg 240
 aattcgagct cggcgcgcca agctt 265

<210> 34
 <211> 257
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polylinker-Terminator-Polylinker

<400> 34
 ggatccgata tcgggcccgc tagcggttaac cctgctttaa tgagatatgc gagacgccta 60
 tgatogcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacgtt gtaaaaaacc tgagcatgtg 120
 tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggtt cattctaataa aatatatcac ccgttactat 180
 cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtoga cgaattcgag 240
 ctcggcgcgc caagctt 257

<210> 35
 <211> 257
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Polylinker-Terminator-Polylinker

<400> 35
 agatctgccg gcatcgatcc cgggccatgg cctgctttaa tgagatatgc gagacgccta 60
 tgatogcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacgtt gtaaaaaacc tgagcatgtg 120
 tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggtt cattctaataa aatatatcac ccgttactat 180
 cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtoga cgaattcgag 240
 ctcggcgcgc caagctt 257